

**Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare
Diagnostik**

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
(Geschäftsführender Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. H. Renz)

und

des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Evaluierung des Homocystein - Immunoassays
am Immulite 2500**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich der Humanmedizin der Philipps-Universität
Marburg

Vorgelegt von
Britta Zerbian aus Hamburg

Marburg 2010

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am
14.10.2010

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Univ.- Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. H. G. Wahl

1. Koreferent: Prof. Dr. A. Heufelder

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Adamkiewicz, Albert, Aumüller, Barth, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Behr, Berger, Bien, Büch, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, del Rey, Dünne, Dominguez, Donner-Banzhoff, Duda, Eberhart, Eilers, Feiber, Feuser, Fuchs, Garten, Geks, Gemsa, Gerdes, Geus, Görg, Gotzen, Grimm, Griss, Groß, Grzeschik, Gudermann, Happle, Hartmann, Hasilik, Hertl, Hofmann, Hörle, Hoyer, Jaques, Jungclas, Kalder, Kann, Kanngiesser, Kill, Kim-Berger, Klaus, Kleine, Klenk, Klose, König, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhlmann, Kühnert, Kunz, Lang, Langer, Lemke, Lenz, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mandrek, Mann, Martin, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Netter, Oertel, Peter, Quante, Rehder, Reinartz, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Röper, Rose, Rosenow, Rothmund, Rucholtz, Rupp, Schäfer, Schmidt, Schmitt, Schmitz, Schnabel, Schneider, Schneyer, Schultz, Schunck, Seitz, Sommer, Steiniger, Stiewe, Stiletto, Strempel, Studer, Sure, Tebbe, Vedder, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Wahl, Waldegger, Weihe, Weiler, Werner, Wiegandt, Wilke, Wulf.

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Wahl für die Vergabe der Doktorarbeit, die Unterstützung und Betreuung der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt den freundlichen und hilfsbereiten Medizinisch Technischen Assistenten/innen des Zentrallaboratoriums der Universitätsklinik Marburg. Sie haben die Arbeitsatmosphäre im Labor durch ihre unkomplizierte, freundliche und kompetente Art jederzeit angenehm gestaltet. Vielen Dank für die Hilfe, Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Meiner Familie danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und die Förderung meiner Motivation.

Meinen persönlichen Dank möchte ich Iris Wehmer und Maria Sommer aussprechen, die viele Stunden der Freude und des Leids mit mir im Labor geteilt habe.

MEINER FAMILIE

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	8
1.1	Homocystein	8
1.1.1	Homocysteinstoffwechsel	9
1.1.2	Ursachen einer Hyperhomocysteinämie	11
1.1.3	Pathomechanismen	14
1.1.4	Diagnostik, Prophylaxe und Therapie	16
1.2	Fragestellung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Materialien	19
2.1.1	Patientenproben und Probenaufbewahrung	19
2.1.2	Immolute 2500	19
2.1.3	ADVIA Centaur	22
2.1.4	HPLC	24
2.2	Methodik	25
2.2.1	Immolute 2500 Homocystein	25
2.2.2	ADVIA Centaur	26
2.2.3	HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)	27
2.2.4	Analytische Evaluierung	29
2.2.4.1	Intra-Assay-Präzision	29
2.2.4.2	Inter-Assay-Präzision	29
2.2.4.3	Verdünnungslinearität	30
2.2.4.4	Verschleppung	30
2.2.4.5	Stabilität	30
2.2.4.6	Methodenvergleich	31
2.3	Statistische Methoden	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Analytische Evaluierung	32
3.1.1	Intra-Assay-Präzision	32
3.1.2	Inter-Assay-Präzision	32
3.1.3	Verdünnungslinearität	33
3.1.4	Verschleppung	34
3.1.5	Stabilität	35
3.1.6	Methodenvergleich	43
3.2	Aufgetretener Fehler beim Immolute 2500 Homocystein-Assay	54
4	Diskussion	55
4.1	Homocystein als Risikofaktor	55
4.2	Analytische Evaluierung	56
4.2.1	Standardisierung des Assays	56
4.2.2	Präzision des Assays	57
4.2.3	Präanalytische Variabilität	58
4.2.4	Zeitdauer bis zum Messergebnis	59
5	Zusammenfassung	60

6 Tabellenverzeichnis.....	62
7 Abbildungsverzeichnis.....	63
8 Abkürzungsverzeichnis.....	64
9 Literaturverzeichnis	65
10 Anhang.....	70

1 Einleitung

1.1 Homocystein

Homocystein (Abbildung 1) ist eine schwefelhaltige, nicht-proteinogene Aminosäure, die als Intermediärprodukt im Stoffwechsel der essentiellen Aminosäure Methionin entsteht.

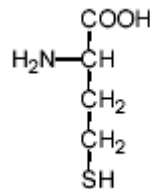


Abbildung 1: Strukturformel des Homocysteins

In den 60er Jahren konnte Homocystin, das durch Dimerisierung des Homocysteins entsteht, im Urin von Kindern nachgewiesen werden, die ein Syndrom aus mentaler Retardierung, Marfan-ähnlichem Habitus und frühem, plötzlichem Tod an Schlaganfällen oder Herzinfarkten aufwiesen. Bei diesem, als Homocystinurie bezeichneten Syndrom handelt es sich um eine autosomal-rezessive Erbkrankheit (Mudd et al., 1964; Gerritsen et al., 1962). 1969 zeigte McCully, dass ein Zusammenhang zwischen erhöhten Homocysteinkonzentrationen und atherosklerotischen Gefäßerkrankungen besteht (McCully, 1969). Mittlerweile gibt es viele wissenschaftliche Arbeiten, die veranschaulichen, dass Homocystein ein unabhängiger Risikofaktor für koronare und zerebrovaskuläre Gefäßerkrankungen darstellt (Boushey et al., 1995; Wald et al., 2002; Gravina-Taddei et al., 2005; Stampfer et al., 1992). Nach Schätzung einer Meta-Analyse, die 27 Studien zusammenfasst, lassen sich etwa 10% des Bevölkerungsrisikos für kardiovaskuläre Erkrankungen auf erhöhte Homocysteinwerte zurückführen (Boushey et al., 1995). Die Hordaland Homocystein Studie und weitere Studien zeigten, dass erhöhte Homocysteinwerte eine erhebliche Relevanz für die Vorhersage kardiovaskulärer, aber auch nicht-kardiovaskulärer, Mortalität besitzen (Vollset et al., 2001; Nygard et al., 1997). Homocystein stellt vor allem bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) (Nygard et al., 1997), peripherer arterieller Verschlusskrankheit (PAVK) (Taylor et al., 1997), Nierenfunktionsstörungen (Moustapha et al., 1998) und Diabetes (Stehouwer et al., 1999, Hoogeveen et al., 2000) einen zusätzlichen Risikofaktor für die Mortalität innerhalb dieser Patientengruppen dar. Eine Beziehung zwischen Hyperhomocysteinämie und venöser Thrombose konnte ebenfalls in verschiedenen Studien demonstriert werden (Bienvenu et al., 1993; Tsai et al. 2003). Neuere Untersuchungen liefern Hinweise darauf, dass eine erhöhte Homocysteinkonzentration im Plasma mit der Entwicklung von Alzheimer und vaskulärer Demenz assoziiert ist (Quadri et al., 2005; Seshadri et al., 2002). Eine positive Korrelation besteht weiterhin zwischen erhöhten Homocysteinwerten und Neuralrohrdefekten (Rosenquist et al., 1996; Mills et al., 1995) sowie zwischen erhöhten Homocysteinwerten und

Schwangerschaftskomplikationen wie Präeklampsie, Frühgeburt oder geringem Geburtsgewicht (Vollset et al., 2000). Aktuellere Ergebnisse weisen auf einen positiven Zusammenhang zwischen Osteoporose bzw. Osteoporose bedingten Frakturen/Hüftfrakturen älterer Personen und einem erhöhten Homocysteinspiegel hin (McLean et al., 2004; van Meurs et al., 2004).

Die Wertigkeit von Homocystein als Risikofaktor entspricht etwa der des Rauchens oder der Hyperlipidämie (Graham et al., 1997). Das Risiko kann sich erhöhen, wenn gleichzeitig mehrere Risikofaktoren vorliegen (Graham et al., 1997; Becker et al., 2003; Foody et al., 2000; O'Callaghan et al., 2002). Eine Senkung des Homocysteinspiegels um 3 $\mu\text{mol/l}$ kann das Risiko einer ischämischen Myokarderkrankung (KHK) um 16%, das einer tiefen Beinvenenthrombose um 25% und das eines Schlaganfalls um 24% mindern (Wald et al., 2002).

Als allgemein gebräuchliche Referenzwerte gelten Homocysteinkonzentrationen von 5-15 $\mu\text{mol/l}$ (Ueland et al., 1993). Bei Schwangeren und Kindern liegen die Homocysteinwerte in der Regel tiefer als bei Erwachsenen (Refsum et al., 2004). Die Deutsch-Österreichische-Schweizer-Liga (D.A.CH.-Liga) Homocystein unterscheidet zwischen moderater (>12 bis <30 $\mu\text{mol/l}$), intermediärer (30-100 $\mu\text{mol/l}$) und schwerer Hyperhomocysteinämie (>100 $\mu\text{mol/l}$) (Stanger et al., 2003). Es ist zu bedenken, dass die oberen Referenzwerte einer Population um 20-25% sinken, wenn diese mit Folsäure angereicherte Nahrung zu sich nimmt (Refsum et al., 2004).

1.1.1 Homocysteinestoffwechsel

Homocystein ist ein schwefelhaltiges Intermediärprodukt im Stoffwechsel der essentiellen Aminosäure Methionin. Im menschlichen Organismus wird Methionin entweder für die Proteinsynthese oder für die Bildung von S-Adenosyl-Methionin (aktivierte Form) genutzt. Wegen des hohen Gruppenübertragungspotentials ist S-Adenosyl-Methionin ein wichtiger Methylgruppendonator. Die Methylgruppe wird auf verschiedene Akzeptoren übertragen, wie z.B. auf DNS, RNS, Proteine, Phospholipide, Myelin, Polysaccharide, Katecholamine u.a. Somit ist S-Adenosyl-Methionin der wichtigste biologische Methylgruppendonator im Organismus und der einzige im zentralen Nervensystem. Durch Abgabe der Methylgruppe entsteht Homocystein. Aus toxikologischer Sicht ist es wichtig, dass das intermediär anfallende Homocystein schnell aus dem Körper eliminiert wird. Ein direkter Weg der Ausscheidung findet sich über die Nieren. Nur etwa 1-2% des Homocysteins, welches von den Glomeruli filtriert wird, wird normalerweise über den Urin ausgeschieden. Der Rest wird in den Tubuli der Niere rückresorbiert und metabolisiert (Refsum et al., 1985; Guttormsen et al., 1993). Neben diesem direkten Weg der Ausscheidung gibt es zwei Stoffwechselwege, die die Homocysteinkonzentration beeinflussen: Die Transsulfurierung zu Cystein und die Remethylierung zu Methionin.

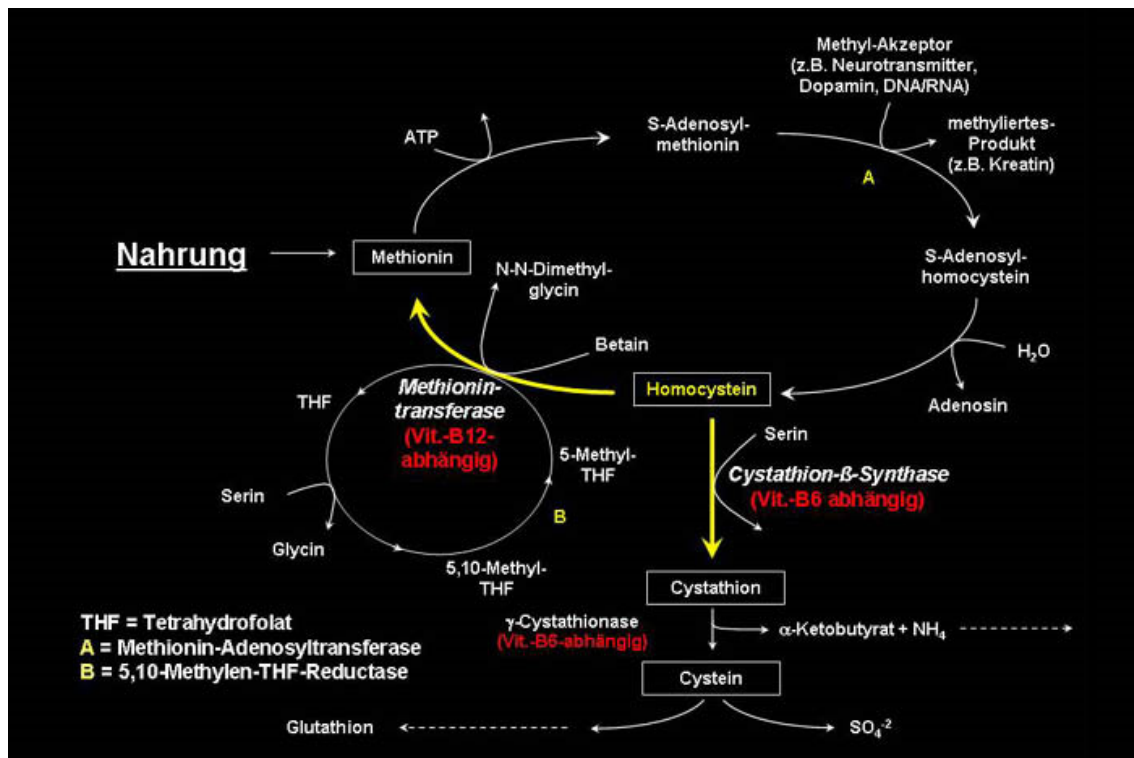


Abbildung 2: Homocysteinestoffwechsel (aus dem Konsensuspapier der D.A.CH.-Liga Homocystein)

An der Transsulfurierung sind die Enzyme Cystathionin-β-Synthase und γ-Cystathionase beteiligt. Beide benötigen Vitamin B₆ (Pyridoxal-Phosphat) als Kofaktor. Die Umwandlung zu Cystein erfolgt in zwei Schritten und ist irreversibel. Im ersten Schritt wird Homocystein mit Serin durch die Cystathionin-β-Synthase mit Vitamin B₆ als Kofaktor zu Cystathionin kondensiert. Der zweite Schritt besteht in einer Spaltung des Cystathionin zu Cystein und α-Ketobutyrat, katalysiert durch die γ-Cystathionase, wiederum mit Vitamin B₆ als Kofaktor. Dieser Stoffwechselweg ist wichtig für die Synthese von Glutathion. Glutathion dient als Radikalfänger und schützt so viele zelluläre Komponenten gegen oxidative Schäden.

Die Remethylierung zu Methionin wird katalysiert durch die Methionin-Synthase und ist abhängig von Vitamin B₁₂ (Cobalamin) und 5-Methyltetrahydrofolat (5-Methyl-THF). Das 5-Methyl-THF wird durch die 5,10-Methyltetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) aus 5,10-Methyltetrahydrofolat (5,10-Methylen-THF) synthetisiert. Die Verfügbarkeit von 5,10-Methylen-THF ist von der Folsäureaufnahme mit der Nahrung abhängig. Eine andere Möglichkeit der Remethylierung zu Methionin ist durch die Betain-Homocystein-Methyltransferase gegeben. Hierbei überträgt Betain die Methylgruppe auf Homocystein. Dieser Vorgang ist allerdings nicht im ZNS vorhanden (Scott et al., 1994). Die Remethylierung und die Transsulfurierung stehen etwa im gleichen Verhältnis zueinander. Eingeschränkte Enzymaktivitäten wie auch Defizite der genannten Vitamine führen zu einer intrazellulären Akkumulation von Homocystein, welches nachfolgend aufgrund seiner Zelltoxizität aus der Zelle exportiert wird und im Plasma nachweisbar ist.

Homocystein liegt im Plasma zu 70-80% über Disulfidbrücken an Proteine gebunden vor. Freies, ungebundenes Homocystein kondensiert durch Oxidation entweder mit sich selbst und bildet so das symmetrische Dimer Homocystin, oder mit Cystein bzw. Glutathion, um die gemischten Disulfide Cystein-Homocystein oder Glutathion-Homocystein zu bilden (Mansoor et al., 1992). Nur etwa 1% des Homocysteins existiert in freier, reduzierter Form. Die Summe aller Formen ergibt das Gesamt-Homocystein.

1.1.2 Ursachen einer Hyperhomocysteinämie

Alters- und Geschlechtsabhängigkeit:

Generell nimmt die Homocysteinkonzentration im Blut mit dem Alter zu (Selhub et al., 1999; Nygard et al., 1995). Bis zum 60.-65. Lebensjahr verläuft der Anstieg annähernd linear. Anschließend zeigt sich eine deutlich schnellere Erhöhung, die durchschnittlich bei 10% (1 $\mu\text{mol/l}$) pro Dekade liegt (Selhub et al., 1999). Dies lässt sich teilweise mit der physiologischen Abnahme der Nierenfunktion erklären (Bostom and, 1999). Zusätzlich ist im Alter häufig eine adäquate Resorption der Vitamine im Magen-Darm-Trakt nicht mehr gewährleistet (Matthews, 1995).

Nach der Pubertät haben Männer normalerweise höhere Homocysteinwerte als Frauen (Selhub et al., 1999; Nygard et al., 1995; Jaques et al., 1999). Bei 40-42jährigen beträgt die Geschlechterdifferenz bis zu 2 $\mu\text{mol/l}$ (Jaques et al., 1999). Dies kann mit dem unterschiedlichen hormonellen Status (Östrogene haben einen bislang nicht geklärten senkenden Effekt auf den Homocysteinspiegel) (Dierkes et al., 2001; Morris et al., 2000), der größeren Muskelmasse bzw. fettfreien Masse der Männer (Dierkes et al., 2001) und geschlechterspezifischen Unterschieden im Lebensstil (siehe 1.1.2.4) erklärt werden. Nach der Menopause nehmen diese Unterschiede ab, die Homocysteinwerte bleiben jedoch bei Frauen niedriger als bei Männern (Jaques et al., 1999; Dierkes et al., 2001; Morris et al., 2000). Bei der Beurteilung des Homocysteinspiegels sollten daher stets das Alter, das Geschlecht und individuelle Symptome des Patienten bedacht werden.

Genetische Ursachen:

Ein häufiger Enzymdefekt, der zu einer Hyperhomocysteinämie führt, wird hervorgerufen durch eine Punktmutation der MTHFR. Meist findet sich eine Mutation im Nukleotid 677 (MTHFR 677C→T), was zu einer thermolabilen Variante des Enzyms führt (Harmon et al., 1996; Guttormsen et al., 1996; Kang et al., 1991). Personen mit einem MTHFR 677TT Genotyp haben einen um etwa 2,5 $\mu\text{mol/l}$ höheren Homocysteinspiegel, als solche mit der MTHFR 677CC Variante (Klerk et al., 2002; Brattstrom et al., 1998), was allerdings auch von dem Folsäurestatus der Person abhängt (Guttormsen et al., 1996).

Ein homozygoter Gendefekt der Cystathionin- β -Synthase führt zu der seltenen, autosomal-rezessiv vererbten Homocystinurie. Diese kann mit Homocysteinwerten von mehr als 100 $\mu\text{mol/l}$

einhergehen (Mansoor et al., 1993). Die Prävalenz dieser klassischen Homocystinurie beträgt weltweit etwa 1:300 000 (Mudd et al., 1995).

Die meisten Personen mit einem heterozygoten Gendefekt der Cystathionin- β -Synthase haben normale Homocysteinwerte, allerdings können die Homocysteinkonzentrationen im Urin erhöht sein (Guttormsen et al., 2001). Auch nach einem Methionin-Belastungstest kann es zu einem erhöhten Anstieg des Homocysteins kommen (Guttormsen et al., 2001; Tsai et al., 1996).

Andere mögliche Enzymdefekte (Methionin-Synthase, Methionin-Synthase-Reduktase u.a.) sind sehr selten.

Vitaminmangel:

Die häufigste Ursache einer Hyperhomocysteinämie ist der Vitaminmangel. Vielen Untersuchungen zu Folge bestimmt die Aufnahmemenge von Folsäure, Vitamin B₆ und Vitamin B₁₂ wesentlich den Homocysteinspiegel im Blut (Selhub et al., 1993; Clarke et al., 1998; Kang et al., 1987; Lindenbaum et al., 1994; Ubbink et al., 1996). Dabei hat der Vitaminmangel einen primären Effekt auf den Prozeß der Remethylierung von Homocystein zu Methionin, in welchem 5-Methyl-THF als Substrat und Vitamin B₁₂ als Koenzym fungieren (Stipanuk, 1986; Klee, 2000).

Der häufigste Vitaminmangel in Europa ist der Folsäuremangel. Folsäure kommt vor allem in grünem Gemüse, Obst, Getreideprodukten und Hefe vor. Die durchschnittliche Folsäureaufnahme mit der Nahrung liegt bei unter 300 μ g täglich und damit deutlich unter dem empfohlenen Richtwert von 400 μ g täglich (Beitz et al., 2002).

Studien demonstrieren eine lineare Beziehung zwischen ansteigenden Folsäure-Spiegeln und abfallenden Homocysteinkonzentrationen bei verstärkter Einnahme von Folsäure. Folsäure in einer Dosis von 0.5 - 5 mg täglich zeigt eine Verringerung des Homocysteinspiegels um etwa 25% (Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration, 1998). In den USA werden seit Januar 1998 Mehlprodukte mit Folsäure angereichert. Dies führte zu einer Senkung des Folsäuremangels innerhalb der Bevölkerung von über 20% auf etwa 1% (Jaques et al., 1999). Das Auftreten von Neuralrohrdefekten konnte dadurch um bis zu 50% gesenkt werden (Mills and, 2004) und auch die Prävalenz der Hyperhomocysteinämie ging auf etwa die Hälfte zurück (Jaques et al., 1999).

Im Gegensatz zu Folsäure wird Vitamin B₁₂ (Cobalamin) meist in ausreichenden Mengen mit der Nahrung aufgenommen. Es ist vor allem in tierischen Nahrungsmitteln wie Fisch, Fleisch, Eiern und Milchprodukten vorhanden. Häufig kommt ein Vitamin B₁₂-Mangel bei älteren Menschen vor, bedingt durch unzureichende Aufnahme mit der Nahrung oder unzureichende Resorption im Magen-Darm-Trakt (verminderte Magensäuresekretion, Mangel an „*intrinsic factor*“, atrophische Gastritis) (Matthews, 1995). Die zusätzliche Gabe von Vitamin B₁₂ zur Folsäuresubstitution kann zu einer weiteren Reduktion des Homocysteinspiegels um etwa 7% führen (Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration, No authors listed, 1998). Ein Vitamin B₆-Mangel beeinflusst die Homocysteinkonzentration vergleichsweise wenig. Vitamin B₆ kommt vor allem in Fleisch, Milch, Kartoffeln, Vollkornprodukten, Obst und Gemüse vor. In der „*Framingham Heart Study*“ wurde gezeigt, dass eine Vitamin B₆-Aufnahme von weniger als 1,4

mg täglich leicht erhöhte Homocysteinkonzentrationen zur Folge hat (Selhub et al., 1993). Eine neuere Untersuchung hingegen verdeutlicht, dass eine Einschränkung der Vitamin B₆ Aufnahme keinen Einfluss auf die Remethylierung oder die Synthese von Homocystein in gesunden Frauen und Männern hat (Davis et al., 2005).

Sonstige Ursachen:

Erhöhte Homocysteinkonzentrationen können eine Folge des jeweiligen Lebensstils sein. Sie können hervorgerufen werden durch Rauchen (Interferenz mit Vitamin B₆, B₁₂ und Folsäure) (Nygard et al., 1998), starken Kaffeeconsum (Coffein ist ein Vitamin B₆-Antagonist, erhöhter Methylgruppenbedarf) (Nygard et al., 1998) und übermäßigen Alkoholgenuss (Interferenz mit Vitamin B₆, B₁₂ und Folat, Enzymhemmung) (Cravo et al., 1996). Eine entscheidende Rolle spielt im Zusammenhang mit diesen Faktoren der jeweilige Folsäure-Status. Trotz hohem Zigaretten- und Kaffeeconsum, kann eine Folsäuresubstitution den Homocysteinspiegel verringern. Umgekehrt kann ein Folsäuremangel die durch die Faktoren des Lebensstils hervorgerufene Hyperhomocysteinämie verstärken (Nygard et al., 1998). Die Untersuchung von Nichtrauchern mit geringem Kaffeeconsum und hoher Folsäureaufnahme zeigte, dass sie im Mittel eine um 3 bis 4,8 µmol/l geringere Homocysteinkonzentration aufwiesen, als der Rest der untersuchten Probanden (Nygard et al., 1998).

Es gibt Untersuchungen die zeigen, dass auch körperliches Training zu einer Erhöhung des Homocysteinspiegels führen kann (Herrmann et al., 2003; Herrmann et al., 2003).

Eine häufige Ursache für eine Hyperhomocysteinämie ist eine eingeschränkte Nierenfunktion (Guttormsen et al., 1997; Takenaka et al., 2005). Bis zu 85% der Dialysepatienten leiden an einer Hyperhomocysteinämie (Bostom et al., 1995; Bostom et al., 1996). Neben der pathologischen Abnahme der Nierenfunktion bei Dialysepatienten, führt aber auch eine altersbedingte, physiologische Reduktion der Nierenfunktion zu erhöhten Homocysteinwerten (Bostom and 1999).

Es gibt zahlreiche Arzneistoffe, die den Homocystein-Stoffwechsel beeinflussen können. Meistens wirken sie als direkte oder indirekte Antagonisten von Kofaktoren bzw. Enzymen oder interferieren mit der renalen Elimination des Homocysteins (siehe Tabelle 1) (Stanger et al., 2003).

Tabelle 1: Arzneistoffe, die eine Hyperhomocysteinämie verursachen können (aus dem Konsensuspapier der D.A.CH.-Liga Homocystein)

Medikamente	Mechanismus
Metformin Omeprazol Colestyramin/Cholestipol	Verminderte Resorption von Vitamin B ₁₂
Antifolate (z. B. Methotrexat, Trimethoprim)	Hemmung der Dihydrofolatreduktase
Antiepileptika	Folsäureantagonismus
Sulfasalazin	Hemmt Dihydrofolat-Reduktase

	und Folatabsorption
Theophyllin, Coffein, Isoniazid	Vitamin B ₆ -Antagonismus
Cyclosporin A, Fibrate	Evtl. Nierenfunktionsstörungen
Lachgas (N ₂ O)	Cobaltoxidation, Vitamin B ₁₂ - und Methioninsynthase-Inaktivierung
L-Dopa	Substrat für S-Adenosyl-Methionin-abhängige Methylierung

Proliferative Erkrankungen wie Psoriasis, Akute Lymphatische Leukämie und Rheumatoide Arthritis können die Homocysteinkonzentration im Plasma durch vermehrte Zellproliferation steigern (Refsum et al., 1991; Refsum et al., 1989).

1.1.3 Pathomechanismen

Homocystein schädigt auf verschiedene Arten den menschlichen Organismus. Wichtig sind vor allem die atherogenen, die neurotoxischen und die knochenschädigenden Eigenschaften.

Atherosklerose

Homocystein kann über folgende pathophysiologische Mechanismen wirken:

- Direkte Endotheltoxizität und Steigerung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation
- Förderung der oxidativen Modifikation von Lipiden und Lipoproteinen
- Proliferationsfördernde Wirkung auf glatte Muskelzellen der Gefäßwand
- Steigerung der prothrombotischen Aktivität im Gefäßendothel
- Degeneration elastischer Fasern und vermehrte Synthese kollagener Fasern

Endothelzellen: In vitro wirkt Homocystein dosisabhängig toxisch auf Endothelzellen und reduziert die Vitalität und die Proliferation dieser Zellen (Dudamn et al., 1991; Jones et al., 1994; Tsai et al., 1994). Untersuchungen zeigten, dass es sich dabei wahrscheinlich um einen Radikal-vermittelten Prozeß handelt (Wall et al., 1980; Starkebaum and; 1986). Durch Oxidation des Homocysteins werden reaktive Sauerstoffspezies frei (Wasserstoffperoxid, Superoxidanionen und Hydroxylradikale), welche direkt toxisch auf das Endothel wirken und vasoprotektives Stickstoffmonoxid (NO, *endothelium derived relaxing factor*, ERDF) inaktivieren (Wall et al., 1980). NO inhibiert die Leukozyten-Adhäsion (Takahashi et al., 1996), die Proliferation von glatten Muskelzellen (Dubey, 1994) und die Oxidation von *low-density* Lipoproteinen (LDL) (Hogg et al., 1995). Des weiteren hemmt NO die Adhäsion (Radomski et al., 1993), Aggregation (Emerson et al., 1999) und Aktivierung (Broekman et al., 1991) von Thrombozyten, so dass durch die Inaktivierung des NO diese protektiven Funktionen vermindert werden.

Lipidoxidation: In vitro Untersuchungen zeigen, dass durch die Oxidation von freiem Homocystein Radikale entstehen können, die in zellfreien Systemen mehrfach ungesättigte

Fettsäuren von Phospholipiden und LDL-Partikeln oxidieren können (Parthasarathy, 1987; Heinecke et al., 1993; Hirano et al., 1994). Oxidativ modifizierte LDL haben eine erhöhte Affinität zum Makrophagen-*Scavenger*-Rezeptor, so dass hierüber Cholesterin und Cholesterinester in Makrophagen akkumulieren. Cholesterinspeichernde Makrophagen wandeln sich in Schaumzellen des atherosklerotischen Plaques um. Ob dieser Mechanismus auch in vivo eine Rolle spielt, ist nicht bekannt (Witztum and, 1991; Steinberg et al., 1989). Andere Untersuchungen stellen keinen Zusammenhang zwischen erhöhtem Homocystein und einer vermehrten radikalvermittelten Oxidierung von LDL-Partikeln her (Halvorsen et al., 1996; Blom et al., 1992; Dudman et al., 1993).

Gefäßmuskulatur: Homocystein stimuliert dosisabhängig die DNS-Synthese und Proliferation glatter Gefäßwandmuskelzellen und fördert die Proliferation ruhender glatter Muskelzellen (Tsai et al., 1994).

Blutgerinnung: Bei Patienten mit KHK besteht eine positive Korrelation zwischen der Plasma-Homocysteinkonzentration und der Fibrinogenkonzentration (von Eckardstein et al., 1994). Homocystein steigert die prokoagulatorische Aktivität durch eine dosisabhängige Aktivierung von Faktor V und eine gesteigerte Faktor Xa-vermittelte Prothrombinaktivierung (Rodgers et al., 1988). Antikoagulatorische Faktoren werden durch eine Hemmung der Aktivierung von Protein C in Endothelzellen, durch eine Hemmung der Zelloberflächenexpression von Thrombomodulin oder durch eine Blockade der Bindung von Gewebsplasminogenaktivator an Endothelzellen inhibiert (Rodgers and, 1990; Lentz and, 1991; Fryer et al., 1993).

Bindegewebe: Hohe Homocysteinkonzentrationen stimulieren die Kollagensynthese und -akkumulation in kultivierten glatten Muskelzellen von Arterien (Majors et al., 1997; Majors et al., 2002). In vivo konnten diese Ergebnisse in Tiermodellen bestätigt werden (Zhou et al., 2001; Lubec et al., 1996). Auch bei Patienten mit Hyperhomocysteinämie und akutem Koronarsyndrom konnte post mortem eine erhöhte Kollagen-Ablagerung gefunden werden (Burke et al., 2002).

Neurotoxische Wirkung

Die schematische Darstellung des Homocysteinstoffwechsels verdeutlichte bereits, dass S-Adenosyl-Methionin, welches durch die Remethylierung von Homocystein entsteht, ein wichtiger Methylgruppendonator ist. Es ist vielfach belegt, dass es durch Remethylierungsstörungen zu einem Verlust an Methylgruppen und folglich zu einer zerebralen Demyelinisierung kommen kann (Surtees, 1993; Surtees et al., 1991; Scott et al., 1981; Hyland et al., 1988; Allen et al., 1998). Durch Abgabe der Methyl-Gruppe entsteht aus S-Adenosyl-Methionin S-Adenosyl-Homocystein, welches ebenfalls eine inhibitorische Wirkung auf alle Methyl-Transferasen, die S-Adenosyl-Methionin als Methylgruppendonator nutzen, hat (Surtees, 1998).

Ursache einer weiteren neurotoxischen Wirkung ist die Bindung des Homocysteins an die Glutamat-Seite des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors (NMDA-Rezeptor) (Agnati et al., 2005; Lipton et al., 1997). Die Bindung kann zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und damit zu einer

osmotischen Lyse oder dem Absterben der Nervenzelle durch Apoptose führen (Lipton et al., 1997). NMDA-Rezeptor-Antagonisten können diese Wirkung reduzieren (Lipton et al., 1997). Auch die bereits beschriebenen atherosklerotischen Veränderungen durch Homocystein können zu einer Minderversorgung der Neuronen mit Sauerstoff und somit zu ihrem Absterben führen (Agnati et al., 2005).

Knochenschädigende Wirkung

Bereits 1966 wurde gezeigt, dass Homocystein mit der Kollagen-Quervernetzung interferiert und zu einer verminderten Knochenstabilität führt (McKusick, 1966). Bis heute ist die Rolle, die Homocystein im Knochen-Metabolismus spielt, jedoch wenig geklärt. Es gibt vier Hypothesen der knochenschädigenden Wirkung von Homocystein (Herrmann et al., 2005; Herrmann et al., 2005):

- Die Behinderung der Knochenbildung durch Inhibition der Osteoblasten-Differenzierung und/oder Reduzierung der Osteoblasten-Aktivität
- Die Aktivierung der Osteoklasten-Bildung/-Differenzierung und/oder der Osteoklasten-Aktivität.
- Vaskuläre Mechanismen, die zu einer verminderten Durchblutung des Knochens mit gestörter Osteoklasten- oder Osteoblasten-Funktion führen könnten.
- Die direkte Wechselwirkung des Homocysteins mit extrazellulären Matrix-Proteinen, resultierend in strukturellen Veränderungen und einer verringerten Stabilität des Knochens.

1.1.4 Diagnostik, Prophylaxe und Therapie

Die Nachweismethoden für die Homocysteinbestimmung werden grundsätzlich in zwei Gruppen eingeteilt: i) chromatographische Analysen bzw. ii) Enzym- und Immunoassays. Der Vorteil chromatographischer Bestimmungen liegt in der großen analytischen Breite, der gleichzeitigen Bestimmung verschiedener Metabolite und im geringeren Kostenaufwand (Refsum et al., 2004). Nachteilig sind dagegen die Notwendigkeit von Fachpersonal für die Durchführung der Analysen sowie die relativ aufwendige Materialbearbeitung und der geringe Probendurchsatz. Die Enzym- und Immunoassays zeichnen sich dagegen durch ihre einfache Handhabung aus, sind jedoch in ihrer Kapazität auf die Bestimmung eines Metaboliten (Homocystein) beschränkt und sehr kostenintensiv (Refsum et al., 2004).

Die gebräuchlichsten Analyseverfahren zur Bestimmung der Homocystein-Konzentration im Patientenplasma, einschließlich des benötigten Probenumfangs sowie der Intra- und Interassay-Präzision sind in Tabelle 2 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 2: Charakteristik derzeitig verfügbarer Methoden zur Homocysteinbestimmung
(modifiziert nach Ducros et al., 2002).

Methode	Plasma- volumen (µl)	Gesamt-HCY Intraassay (VK in %)	Gesamt-HCY Interassay (VK in %)
Chromatographie-Massenspektrometrie			
Gas-Chromatographie	100	~ 5	2,6 – 5,7
Flüssigkeits-Chromatographie	100	3,6 – 5,3	2,9 – 5,6
Chromatographie-HPLC			
Photometrische Bestimmung	k. A.	1,5	2,5
Fluorimetrische Bestimmung	50 – 100	1	3,2 – 4,8
Elektrochemische Bestimmung	60	3,9	5,6
Ionenaustausch-Chromatographie			
	500	5	7,8
Kapillarelektrophorese			
Photometrische Bestimmung	k. A.	k. A.	k. A.
Fluorimetrische Bestimmung	100	k. A.	7,8
Immunoassay (IA)			
Fluoreszenz-IA	50	< 5	3,1
Chemilumineszenz-IA	15	5,4 – 9,9	3,9 – 8,2
Enzym-IA (kolorimetrisch)	25	4,3 – 5,5	5,4 – 8,2
Enzymatische Tests			
	5 – 100	k. A.	2,8 – 3,7

VK– Variationskoeffizient, HCY – Homocystein, k. A. – keine Angaben, IA – Immunassay,
HPLC – Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

Laut der D.A.CH.-Liga Homocystein ist bei 5-10% der Allgemeinbevölkerung und bei bis zu 40% der Patienten mit Gefäßerkrankungen mit einer moderaten Hyperhomocysteinämie (>12 µmol/l) zu rechnen (Stanger et al., 2003). Deshalb sollte die Bestimmung des Homocysteins Teil des individuellen Risikoprofils für Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen sein. Wichtig ist laut D.A.CH.-Liga ausserdem die Identifizierung zusätzlicher Risikofaktoren (Rauchen,

arterieller Hypertonus, Diabetes, Hyperlipidämie), da diese das Gesamtrisiko für atherosklerotische Gefässerkrankungen überproportional steigern. Da ab dem 40. Lebensjahr etwa 50% der Männer und etwa 33% der Frauen mit einer KHK rechnen müssen, sollte der D.A.CH.-Liga zu Folge auch bei Gesunden spätestens ab dem 50. Lebensjahr der Homocysteinspiegel bekannt sein. Als empfehlenswerte Option im Sinne einer Prophylaxe hält die D.A.CH.-Liga, neben einer vitaminreichen Kost, eine „*low dose*“ Ergänzung der Nahrung mit 0,2-0,8 mg/Tag Folsäure, 3-30 µg/Tag Vitamin B₁₂ und 2-20 mg/Tag Vitamin B₆. Wegen der Gefahr der Malabsorption sollten Patienten ab dem 60. Lebensjahr mindestens 100 µg/Tag Vitamin B₁₂ einnehmen. Patienten mit manifester Gefäßerkrankung oder Hochrisikopatienten sollten einen Homocysteinspiegel <10 µmol/l anstreben. Sollte dieses Ziel mit der „*low dose*“-Therapie nicht erreicht werden, ist vor allem die Dosierung der Folsäure zu erhöhen (Folsäure 1-5 mg/Tag, Vitamin B₁₂ 100-600 µg/Tag und Vitamin B₆ 6-25 mg/Tag). Sollte der Homocysteinspiegel weiterhin erhöht bleiben, muss nach anderen Ursachen wie etwa nicht-nutritivem Vitaminmangel oder Nierenerkrankungen gesucht werden (Spezialdiagnostik). Bei Nierenfunktionsstörungen ist trotz einer sehr hohen Vitamindosierung (eventuell auch eine Gabe von 3g Betain/Tag) eine Normalisierung der Homocysteinwerte oft nicht möglich. Bei nicht Vorliegen einer Nierenfunktionsstörung und Homocysteinwerten >30 µmol/l muss an mögliche kongenitale Enzymmängel gedacht werden. Als Therapieversuch sollte die Gabe von 5-15 mg Folsäure, 1 mg Vitamin B₁₂ und >20 mg Vitamin B₆ probiert werden. Bei Therapieversagen ist ebenfalls geeignete Spezialdiagnostik hinzuzuziehen. Eine hochdosierte Monotherapie mit Folsäure ohne Ausschluss eines ursächlichen Vitamin B₁₂-Mangels sollte wegen der Gefahr der Maskierung einer megaloblastischen Anämie und eventueller irreversibler neurologischer Störungen nicht erfolgen. Eine zusätzliche Vitamin B₁₂-Gabe ist zur Vermeidung eines relativen Folsäuremangels und zur Prävention neurodegenerativer Schäden sinnvoll.

1.2 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die an der Abteilung der Klinischen Chemie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg, durchgeführte Evaluierung eines Homocystein-Immunoassays an dem Gerät Immulite 2500 der Firma DPC Biermann. Ziel der Evaluierung war die Sicherstellung der analytischen Zuverlässigkeit und der Eignung des Gerätes für die Verwendung in der Routinediagnostik. Zu diesem Zweck wurden folgende Tests durchgeführt:

- Intra-Assay-Präzision
- Inter-Assay-Präzision
- Verdünnungslinearität
- Verschleppung
- Stabilität
- Methodenvergleich mit bereits etablierten Testsystemen

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Patientenproben und Probenaufbewahrung

Die Untersuchungsmaterialien dienten ausschließlich der Qualitätssicherung im Rahmen der Homocystein-Routinediagnostik des Klinikums der Philipps-Universität Marburg. Die Messungen erfolgten aus Patientenproben, bei denen eine Homocysteinbestimmung angemeldet war. Die Proben wurden anonymisiert eingesetzt.

Die Patientenproben befanden sich in Monovetten der Firma Sarstedt, Nürnberg und hatten ein Volumen von 4 bzw. 7 ml. Sie wurden abpipettiert und wahlweise im Kühlschrank bei 6°C (zur Bearbeitung in den nächsten 24 Stunden) oder im Gefrierschrank bei -24°C aufbewahrt. Jede Probe wurde außerdem archiviert. Zur Verwendung einer tiefgefrorenen Probe wurde diese bei Raumtemperatur aufgetaut, gemischt, zentrifugiert und anschließend an dem jeweiligen Gerät gemessen. Grundsätzlich ist es wichtig, dass die Patientenproben möglichst schnell nach der Blutentnahme zentrifugiert werden, da ansonsten ein Anstieg des Homocysteinspiegels durch extrazellulären Transfer zu beobachten ist, der sich in einer erhöhten Homocysteinkonzentration niederschlägt (Pfund et al., 1999).

2.1.2 Immulite 2500 Homocystein



Abbildung 3: Immulin 2500

Der Immulite 2500 wird von der Firma DPC (*Diagnostic Products Corp.*) Biermann hergestellt und ist ein neuer, vollautomatisierter *Immunoanalyser* mit *Logic Driven Incubation* (LDI)-Fähigkeit. LDI macht das Einbeziehen von STAT Assays möglich. Es ermöglicht die Optimierung der Inkubationszeiten, das Erlangen schnellerer Ergebnisse durch flexible Assayprotokolle und die bevorzugte Behandlung von Notfallproben. Das Gerät verfügt über bidirektionale Inkubatorketten, die jederzeit einen Zugriff auf jede Position der Probe gewährleisten. Die Reagenzien sind im Gerät bei einer konstant gehaltenen Temperatur von 20°C 90 Tage haltbar. Der *Immunoanalyser* zeigt den Reagenzienstatus automatisch an und pipettiert automatisch aus einem neuen Reagenz, das sich im Reagenzienkarussell mit 24 Positionen befindet. Beim Kugelkarussell wird ebenfalls der Assaystatus angegeben.

Der Immulite 2500 hat sechs *Racks* mit jeweils 15 Positionen. Ist die Patientenprobe barcodiert, wird sie von dem Gerät eingelesen. Hat das Gerät den Barcode erkannt, kann der gewünschte Test softwaregesteuert angefordert werden. Zum Pipettieren verwendet der Immulite 2500 eine Pipette, die nach jedem Pipettiervorgang gewaschen wird. Der Pipettiervorgang wird unterbrochen, sollte die Pipettenspitze verstopft sein.

Bei Ergebnissen außerhalb des Messbereichs kann eine Verdünnung der Probe mit variablen Verdünnungsfaktoren sowohl manuell als auch automatisch durchgeführt werden. Der Immulite 2500 besitzt zwei Waschstationen, die mit einem zentrifugalen Waschvorgang arbeiten. Der *Analyser* benutzt außerdem einmalig verwendbare Probenbehälter, um Verschleppungen zu vermeiden.

Reagenzien:

Immulite 2500 Homocystein Reagenzbehälter:

Der Homocystein Reagenzbehälter enthält insgesamt drei Reagenzien:

- 15,5 ml in Puffer verdünnte S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase vom Rind (mit Konservierungsmittel)
- 4,5 ml in Puffer verdünnter Dithiothreitol (DDT)
- 11,5 ml in Puffer verdünnte alkalische Phosphatase konjugiert mit monoklonalen Anti-SAH (S-Adenosyl-Homocystein) Antikörpern von der Maus

Immulite 2500 Homocystein Kugel-Container:

Ein barcodierter Kugel-Container enthält 200 Polystyrol-Kugeln beschichtet mit S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH).

Kalibratoren:

Zur Kalibration des Immulite 2500 Homocystein wurden Kalibratoren der Firma DPC Biermann verwendet. Die Kalibratoren (niedrig und hoch) enthalten synthetisch hergestelltes S-Adenosyl-L-Homocystein in Protein-/Puffer-Matrix. Die Kalibration wurde in einem Intervall von jeweils 14 Tagen vorgenommen oder wenn ein neues Reagenzien-Kit in den Immulite 2500 eingesetzt wurde. Gehandhabt wurden die Kalibratoren wie Patientenproben.

Kontrollen:

Die regelmäßige Qualitätskontrolle wurde mit Kardiomarker-Kontrollen der Firma DPC Biermann durchgeführt. Sie enthalten die mit einem akuten Myokardinfarkt assoziierten Marker Troponin I, Myoglobin, CK-MB und Homocystein. Die Kontrollen sind enthalten in zwei Fläschchen, lyophilisiert, in einer nichthumanen Serum/Puffermatrix mit Konservierungsmittel. Vor dem Gebrauch wurden die Fläschchen mit 3,0 ml destilliertem Wasser rekonstituiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur gelöst. Das Kontrollmaterial, das nicht sofort genutzt wurde, wurde eingefroren. Am Beginn jeden Messtages wurden die Kontrollen in zwei Konzentrationen am Immulite 2500 gemessen. Behandelt wurden sie dabei wie Patientenproben.

Tabelle 3: Immulite 2500 Homocystein Kontrollen ($\mu\text{mol/l}$), (SD=Standardabweichung)

Konzentration	Mittelwert	SD	2SD-Bereich
CCC10007	9,2	1,1	7,0-11,4
CCC20007	18,5	1,67	15,2-21,8

Sonstige Materialien:

Verdünner

Zur automatischen Verdünnung von Proben hoher Konzentration wurde ein Homocystein-Verdünnungspuffer der Firma DPC Biermann verwendet. Er enthält ein gebrauchsfertiges Konzentrat Homocystein-freier Protein-Puffermatrix.

Chemilumineszenz-Substratmodul

Das Substrat der Firma DPC Biermann beinhaltet einen Phosphatester des Adamantyldioxetan.

Waschmodul

Der Firma DPC Biermann für die während des Testes notwendigen Waschschriffe.

Reinigungsmodul

Der Firma DPC Biermann zur täglichen Reinigung des Gerätes.

Einweg-Reaktionsgefäße

Der Firma DPC Biermann

2.1.3 ADVIA Centaur



Abbildung 4: ADVIA Centaur

Der ADVIA Centaur der Firma Bayer Vital GmbH, Fernwald, wurde neben der HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) genutzt, um den Methodenvergleich vorzunehmen.

Das ADVIA Centaur System besteht aus einem vollautomatischen *Immunoassay*-Analysegerät. Zu den Testgruppen gehören Reproduktion, Schilddrüsenfunktion, Tumormarker, Herz-Kreislauf, Anämie, Medikamente, Knochenstoffwechsel, Allergie und Nebennierenfunktion. Alle Assays arbeiten mit direkter Chemilumineszenz-Technologie. Reagenzien, Proben und Vorräte können ununterbrochen eingeladen werden, so dass das System stets einsatzbereit ist. Das Gerät hat 60 *Racks*, welches jeweils fünf Patientenproben fassen kann. Für jeden Pipettierschritt verwendet der Centaur eine neue Pipettenspitze. Der Centaur kann 240 Tests pro Stunde bearbeiten und die Zeit bis zum Ergebnis beträgt 18 Minuten. Der Messbereich des Gerätes liegt für Homocystein zwischen 0,5 und 65 $\mu\text{mol/l}$. Die tägliche Reinigung des Centaur wird automatisch durchgeführt. Die monatliche Reinigung hingegen muss vom Bediener vorgenommen werden.

Reagenzien:

ADVIA Centaur Homocystein *ReadyPack*-Primärreagenzpackung:

Enthalten ist:

- 10 ml *Lite*-Reagenz, bestehend aus monoklonalen Maus-Anti-SAH Antikörpern mit Acridiniumester markiert in Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin und Konservierungsstoffen
- 25 ml *Solid Phase*, bestehend aus kovalent an paramagnetische Partikel gebundenem SAH in Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin und Konservierungsstoffen
- 5,0 ml Enzym-Reagenz, bestehend aus bovinem S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase-Enzym (ca. 60 mE/ml) in TRIS-Puffer mit Konservierungsstoffen

ADVIA Centaur Homocystein *ReadyPack*-Zusatzreagenzpackung:

- 10 ml Reduktionsreagenz, bestehend aus Dithiothreitol in Citratpuffer mit Konservierungsstoffen

Kalibratoren:

Der ADVIA Centaur Homocystein-Test verwendet Kalibratoren mit niedriger bzw. hoher Konzentration an S-Adenosyl-Homocystein in Phosphatpuffer mit Natriumazid (<0,1%) und Konservierungsstoffen der Firma Bayer. Kalibriert wird in einem 14tägigen Intervall. Das Gerät benötigt eine Basiskurvenkalibration, wenn *Lite-Reagenz*, *Solid Phase* und Enzym-Reagenz einer neuen Charge verwendet werden. Zum Einlesen der Basiskurvenangaben der neuen Charge wird die zugehörige Basiskurvenkarte, die die Basiskurvenangaben enthält, über den Barcodeleser oder die Tastatur eingelesen.

Kontrollen:

Verwendet wurden Liquichek Homocystein Kontrollen Level 1 und 2 der Firma BIO-RAD. Die Kontrollen werden aus Humanserum hergestellt und enthalten Zusätze von Konservierungsmitteln, Chemikalien und Bestandteile tierischen Ursprungs. Die Kontrollen liegen flüssig und somit gebrauchsfertig vor. Die Werte sollten bei der Level 1-Kontrolle zwischen 8,3 und 12,5 µmol/l und bei der Level 2-Kontrolle zwischen 24 und 36 µmol/l liegen.

Sonstige Materialien:

Verdünner

Der Homocystein-Diluent der Firma Bayer enthält 10 ml Phosphatpuffer mit Rinder-Gammaglobulin und Konservierungsstoffen.

Cleaning Solution

Gebrauchsfertige Lösung der Firma Bayer

Wash 1

Gebrauchsfertige Lösung der Firma Bayer

Reagenz A (Säure) und Reagenz B (Base)

Gebrauchsfertige Lösungen der Firma Bayer für die Chemilumineszenzreaktion

2.1.4 HPLC

Bei der Methode handelt es sich um ein isokratisches HPLC-Verfahren mit *reversed-phase*-Technik und Fluoreszenzdetektion, die das Gesamt-Homocystein bestimmt. Zur Bestimmung werden Silicagelpartikel, die Kohlenwasserstoffketten hoher Lipophilie an ihrer Oberfläche tragen, eingesetzt. Die Partikel sind mit unpolaren, 18 Kohlenstoffatome enthaltenden Kohlenwasserstoffen belegt (modifiziert) und werden als RP18 bezeichnet. Da die Säulenpackung dieser Partikel einen hohen Widerstand gegen den Flüssigkeitsstrom aufweist, muss das Laufmittel (Elutionsmittel) mit hohem Druck durch die Trennsäule gepumpt werden.

Reagenzien und Analysengeräte:

Reagenzienkit (der Firma Chromsystems GmbH):

Bestehend aus:

- Mobile Phase (*High Performance Elution*)
- *Precipitation Reagent* (Fällungs-Reagenz)
- Interner Standard
- Derivatisierungs-Reagenz 1 (lyophilisiert)
- Derivatisierungs-Reagenz 2
- Reduktions-Reagenz

Analysengeräte:

- Fluoreszenzdetektor der Firma Waters 2475
- Autosampler der Firma Waters 717 plus
- *Binary HPLC Pump* der Firma Waters 1525
- *Software Breeze* der Firma Waters
- Rechner der Firma Compaq
- Drucker der Firma HP Laserjet 1200 series

Kalibratoren:

Zur Kalibration wurden Kalibratoren der Firma Chromsystems, München, verwendet. Es handelt sich um einen lyophilisierten Plasma-Kalibrationsstandard, zu dem 1 ml Aqua dest. gegeben und der dann 10 Minuten bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Rekonstitution stehen

gelassen wird. Die Konzentrationen sind chargenabhängig und in dem Beipackzettel des jeweiligen Kalibrationsstandards aufgeführt. Es handelt sich um eine 1 Punkt Kalibration mit dem Kalibrationsstandard.

Um Verluste, die bei der Probenvorbereitung auftreten können, zu kontrollieren, wird die Probe mit einer definierten Menge des internen Standards aufgestockt. Dem Integrator wird der entsprechende Peak aus dem Kalibrierungslauf als interner Standard zugeordnet. Da sowohl dem Kalibrationsstandard als auch den Proben die gleichen Mengen des internen Standards zugesetzt werden, kann die Konzentration des internen Standards als 1 definiert werden.

Kontrollen:

Es handelt sich um lyophilisierte Matrix-Kontrollen aus Humanserum der Firma Chromsystems in den Leveln I und II, denen je 2,0 ml Aqua dest. zugesetzt werden muß. Die Konzentrationen sind chargenabhängig und können dem jeweiligen Beipackzettel entnommen werden. Die aufgearbeiteten Kontrollen wurden zur Richtigkeits- und Präzisionskontrolle des Systems in jeder Serie mitgeführt.

2.2 Methodik

Nachfolgend sind jeweils die nötigen Probenvorbereitungen sowie die allgemeinen Methoden der verwendeten Analyseverfahren aufgezeigt.

Für den Methodenvergleich wurden folgende Geräte verwendet:

- Immulite 2500 Homocystein-Assay
- ADVIA Centaur Homocystein Test
- HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)

2.2.1 Immulite 2500 Homocystein

Probenvorbereitung:

Eingefrorene Patientenproben werden bei Zimmertemperatur aufgetaut, nachfolgend gemischt und in einer Zentrifuge (Firma Hettich, Rotina 48 S) 12 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Für die Analyse im Immulite 2500 ist eine Menge von 15 µl Plasma oder Serum erforderlich. Hinzu kommt ein Totraumvolumen von 100 µl.

Funktionsweise:

Zu Beginn jeden Messtages wird der Immulite 2500 gespült, bevor die Kontrollen eingesetzt werden. Der Immulite 2500 führt mit den Patientenproben als erstes eine automatische Einzelschritt Vorbehandlung durch. Die Probe wird in einem Röhrchen ohne Kugel mit DTT und der SAH-Hydrolase für 30 Minuten vorbehandelt. Während dieser Inkubation wird das Homocystein zu SAH hydrolysiert. Anschließend wird die vorbehandelte Probe in ein zweites Röhrchen überführt. Dieses Röhrchen enthält eine mit SAH beschichtete Kugel und einen mit alkalischer Phosphatase markierten Antikörper gegen SAH. In der nun folgenden 30minütigen Inkubationszeit konkurriert das im Vorbehandlungsschritt gebildete SAH in der Probe mit dem immobilisierten SAH an der Kugel um die Bindungsstellen des mit alkalischer Phosphatase markierten anti-SAH-Antikörpers. Je mehr Homocystein sich in der Patientenprobe befindet, desto mehr SAH-Antikörper werden von diesem gebunden und desto weniger Antikörper liegen dementsprechend in immobilisierter Form vor.

Im folgenden Waschschrift wird das überschüssige Enzymkonjugat aus dem Röhrchen entfernt. Anschließend wird ein Chemilumineszenzsubstrat in das Reaktionsgefäß gegeben. Dieses Substrat, ein Phosphatester des Adamantylidioxetan, wird von der an der Kugel gebundenen alkalischen Phosphatase in ein instabiles Zwischenprodukt umgesetzt, das beim Zerfall ein Photon aussendet. Die kontinuierliche Produktion dieses Zwischenproduktes führt zu einer anhaltenden Lichtemission (Photonenfreisetzung). Nach fünf Minuten wird das erzeugte Licht mit Hilfe eines Photoverstärkers gemessen. Die ausgesendete Lichtmenge ist direkt proportional zur Menge der gebundenen alkalischen Phosphatase und anti-proportional zur Menge an Homocystein in der Patientenprobe (kompetitiver Immunoassay). Das Lumineszenzsignal wird in *counts per second* gemessen und mit Hilfe einer Eichkurve in die korrespondierende Konzentration an Homocystein umgewandelt.

Die Zeit, von der Anforderung des Testes bis zum Ergebnis beträgt 65 Minuten. Der Messbereich liegt zwischen 2 und 50 $\mu\text{mol/l}$. Am Ende eines jeden Messtages wird der Immulite 2500 mit dem Reinigungsmodul gereinigt.

2.2.2 ADVIA Centaur

Probenvorbereitung:

Die Patientenproben werden analog zur Vorbereitung einer Messung am Immulite 2500 gegebenenfalls aufgetaut, gemischt, zentrifugiert und in einem mit Barcode versehenen Probengefäß in das Gerät geladen. Für eine Einzelbestimmung sind 20 μl Probenvolumen erforderlich. Hinzu kommt ein Totraumvolumen von mindestens 50 μl .

Funktionsweise:

Der ADVIA Centaur Homocystein Test ist ein kompetitiver Immunoassay nach dem direkten Chemilumineszenz-Verfahren. Durch das Reduktionsreagenz werden verschiedene Formen des Homocysteins in der Patientenprobe zu freiem Homocystein reduziert. Die Hydrolase, die in dem Enzym-Reagenz enthalten ist, wandelt das Homocystein zu SAH um. Das umgewandelte, in der Patientenprobe enthaltene SAH, konkurriert mit dem in der *solid Phase* kovalent an paramagnetische Partikel gebundene SAH um eine begrenzte Menge Acridiniumester-markierter anti-SAH-Antikörper im *Lite-Reagenz*.

Das System führt automatisch folgende Schritte durch:

- Dispensiert 20 µl Probe in eine Küvette
- Dispensiert 50 µl Reduktions-Reagenz in die Küvette und inkubiert 3 Minuten bei 37 °C
- Dispensiert 50 µl Enzym-Reagenz in die Küvette und inkubiert 2,5 Minuten bei 37 °C
- Dispensiert 250 µl *Solid Phase* in die Küvette und inkubiert 2,5 Minuten bei 37 °C
- Dispensiert 100 µl *Lite-Reagenz* in die Küvette und inkubiert 2,5 Minuten bei 37 °C
- Trennt, aspiriert und reinigt die Küvetten mit entionisiertem Wasser
- Dispensiert jeweils 300 µl Reagenz A (Säure) und Reagenz B (Base), um die Chemilumineszenz-Reaktion auszulösen

Da es sich um einen kompetitiven Assay handelt, besteht zwischen dem Homocysteingehalt der Patientenprobe und den relativen Lichteinheiten, die vom System erfasst werden, ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang.

Der Centaur kann 240 Tests pro Stunde bearbeiten und die Zeit bis zum Ergebnis beträgt 18 Minuten. Der Messbereich des Gerätes liegt zwischen 0,5 und 65 µmol/l.

2.2.3 HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)

Probenvorbereitung:

In den aufgetauten, gemischten und zentrifugierten Patientenproben wird während der Probenvorbereitung durch einen Reduktionsschritt Homocystein aus seiner Proteinbindung freigesetzt und nach einem Fällungsschritt einer Vorsäulenderivatisierung unterzogen. Der eigentliche Derivatisierungsschritt bedarf dabei einer Inkubationszeit von 10 Minuten.

Probenvorbereitungsschema:

- 100 µl Plasma/Serum (bzw. rekonstituierter Standard oder Kontrolle)
+ 25 µl *Internal Standard*
+ 25 µl *Reduction Reagent* in einem Reaktionsgefäß zusammengeben

- 2 s schütteln und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 100 µl *Precipitation Reagent* zugeben
- Mindestens 30 s schütteln
- 5 – 7 Minuten bei 9000 Umdrehungen pro Minute zentrifugieren
- 100 µl Derivatisierungslösung in einem separaten Reaktionsgefäß vorlegen (Zur Vorbereitung der Derivatisierungslösung wird zu *Derivatisation Reagent 1* 2,0 ml *Derivatisation Reagent 2* gegeben. Die rekonstituierte Derivatisierungslösung ist nach ca. 10 Minuten gebrauchsfertig.)
- 50 µl des unter Punkt 5 erhaltenen Überstands zugeben und durchmischen
- 10 Minuten bei +50 bis +55 °C inkubieren, danach sofort abkühlen
- 20 – 50 µl dieser Lösung in das HPLC-System injizieren

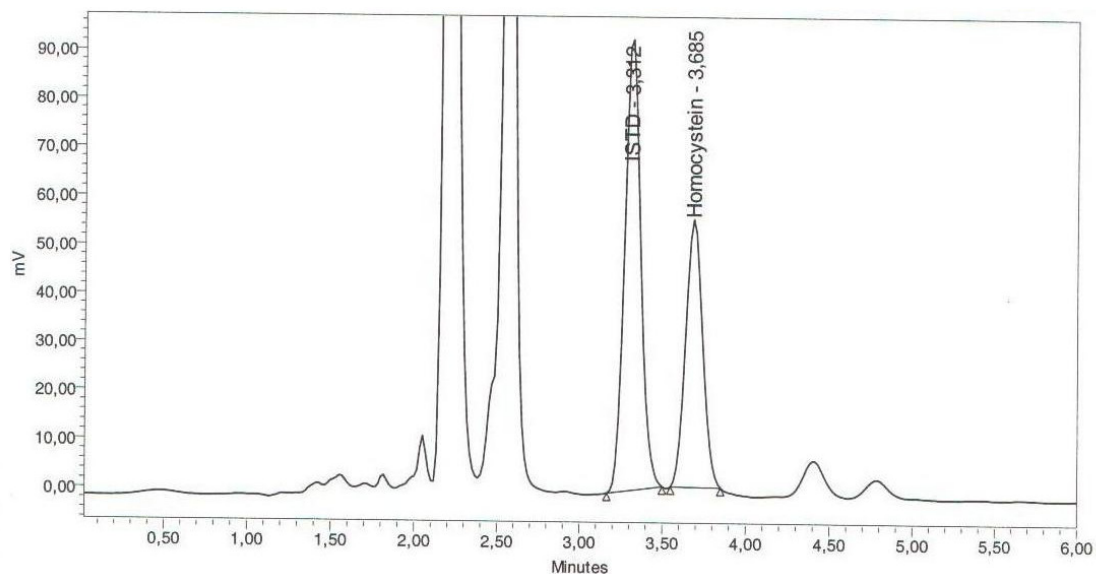
Funktionsweise:

Vor der quantitativen Analytik der aufgearbeiteten Proben sollte ein Kalibrationschromatogramm erstellt werden, welches alle relevanten Komponenten des Probengemisches enthält. Dazu wird, nach Stabilisierung der Basislinie, 20 µl des aufgearbeiteten Kalibrationsstandards (siehe Probenvorbereitung) injiziert und aufgetrennt. Um sicher zu stellen, dass sich das chromatographische System äquilibriert hat, wird der Vorgang wiederholt, bis in zwei aufeinanderfolgenden Chromatogrammen identische Werte bezüglich der Retentionszeit, Peakauflösung, -fläche und -höhe erhalten werden. Anschließend kann mit den Messungen der Patientenproben begonnen werden.

Die Patientenprobe wird wie unter „Probenvorbereitung“ beschrieben vorbehandelt. Nachfolgend wird die Probe mittels Injektion in den Eluentenstrom vor der Trennsäule eingespritzt. Die Probe verteilt sich nun zwischen der lipophilen Oberfläche des Säulenfüllmaterials und dem Laufmittel. Nach einer für die einzelne Substanz charakteristischen Retentionszeit verlässt die Probensubstanz die Trennsäule. Die Substanzdifferenzierung erfolgt mittels Fluoreszenzdetektion, bei der sich die Substanz durch Einstrahlen von UV-Licht (Absorption) zur Lichtemission anregen lässt und längerwelliges Licht abstrahlt (Emission). Die spektrale Verteilung des emittierten Lichtes ist von der Wellenlänge des anregenden Lichtes abhängig. Dieses Licht wird bei der gewählten Emissions-Wellenlänge von der Photozelle erfasst und durch die Auswerteeinheit als Peak dargestellt.

Die Dauer der chromatographischen Trennung beträgt ca. 4 - 5 Minuten. Geringfügige Schwankungen der Retentionszeit können z.B. durch Temperaturveränderungen bedingt sein.

Abbildung 5: Chromatogramm



2.2.4 Analytische Evaluierung

2.2.4.1 Intra-Assay-Präzision

Die Intra-Assay-Präzision wurde ermittelt, um zu überprüfen, ob der Immulite 2500 bei der mehrmaligen Messung der gleichen Probe analoge Ergebnisse aufweist. Die aufeinanderfolgenden Messungen der gleichen Probe wurden innerhalb einer Versuchsreihe vorgenommen. Es wurden Patientenproben in vier verschiedenen Konzentrationen (eine im niedrigen, zwei im mittleren und eine im hohen Messbereich) 20-mal hintereinander gemessen und aus den Ergebnissen wurde der Mittelwert, die Standardabweichung (SD) und der Variationskoeffizient (VK) ermittelt. Intra-Assay-Präzisionsmessungen wurden ebenso mit den Kontrollen Level I und II durchgeführt.

2.2.4.2 Inter-Assay-Präzision

Mittels der Inter-Assay-Präzision wurde ermittelt, ob das zu evaluierende Gerät bei der Messung der gleichen Patientenprobe an aufeinander folgenden Tagen, also in unabhängigen Versuchsreihen, zu möglichst gleichen Ergebnissen kommt. Hierfür wurden Patientenproben im niedrigen, mittleren und hohen Messbereich eingefroren und jeweils eine Probe täglich über einen Zeitraum von 12 Tagen gemessen. Aus den Ergebnissen wurden der Mittelwert, die Standardabweichung (SD) und der Variationskoeffizient (VK) ermittelt. Zusätzlich wurde die Inter-Assay-Präzision anhand von Kontrollen beider Level gemessen.

2.2.4.3 Verdünnungslinearität

Bei der Bestimmung der Verdünnungslinearität wird eine Patientenprobe mit einem Homocysteingehalt im oberen Messbereich in definierten Schritten verdünnt. Anschließend wird ermittelt, ob die am Immulite 2500 gemessenen Werte den Gesetzen der Linearität folgen. Es wurden aus einer Patientenprobe zwei Verdünnungsreihen angesetzt und gemessen.

Tabelle 4: Schema der Verdünnungsreihen

1. und 2. Verdünnungsreihe								
Konzentrationsstufe	1	2	3	4	5	6	7	8
Rel. Konzentration der Probe	1	0,66	0,44	0,30	0,20	0,13	0,09	0,06
Probenvolumen (µl)	500	330	220	148	99	66	44	29,5
Zusatz von Diluent (µl)	-	170	280	352	401	434	456	470,5

2.2.4.4 Verschleppung

Der Test auf Verschleppung wird durchgeführt, um zu ermitteln, ob das Gerät nach der Analyse einer Probe mit hoher Homocysteinkonzentration bei der nachfolgenden Messung eine Probe mit niedriger Homocysteinkonzentration falsch erhöhte Werte detektiert. Dies könnte durch eine eventuelle Verschleppung der hohen Probe in die niedrige Probe zustande kommen. Zur Ermittlung einer möglichen Verschleppung wurden an dem Immulite 2500 achtmal hintereinander jeweils abwechselnd eine hohe und eine niedrige Probe gemessen und für jede Probe aus den Ergebnissen der Mittelwert, die Standardabweichung (SD) und der Variationskoeffizient (VK) ermittelt.

2.2.4.5 Stabilität

Es ist bekannt, dass in unzentrifugierten Blutproben, die bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden, die Homocysteinkonzentration ansteigt (Pfund et al., 1999). Um zu ermitteln, in welchem Ausmaß dieser Effekt in verschiedenen Blutentnahme-Röhrchen auftritt, wurden jeweils 12 Blutproben Heparin-Plasma, Serum und EDTA-Plasma (letzteres nur 5 Proben) zentrifugiert und unzentrifugiert bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Homocysteinkonzentrationen wurden nach Blutentnahme und Zentrifugation (Zeitpunkt 0), sowie nach 0,5, 1, 2, 6, 12 und 24 Stunden bestimmt. In den letzten fünf der zwölf Messreihen wurde zusätzlich der Vier-Stunden-Wert bestimmt. Die Definition des Zeitpunktes 0 war so gewählt, dass die Zentrifugation der zu zentrifugierenden Proben erst erfolgte, nachdem in den Serum-Röhrchen eine Gerinnung stattgefunden hat, d. h. die erste Messung fand in allen

Röhrchen 10 bis 20 Minuten nach Blutentnahme statt. Somit waren für alle Röhrchen und die Homocysteinkonzentrationen die gleichen Ausgangsbedingungen gegeben. Die nicht zentrifugierten Proben wurden als Vollblut stehen gelassen und erst kurz vor dem Messzeitpunkt abpipettiert und zentrifugiert. Anhand der ermittelten Daten wurde berechnet, um wie viel Prozent bzw. $\mu\text{mol/l}$ die Homocysteinkonzentration nach 24 Stunden angestiegen und zu welchem Zeitpunkt ein signifikanter Homocysteinanstieg (5-7%) zu verzeichnen war. Um zu ermitteln, ob die verschiedenen Koagulanzen der verwendeten Blutentnahmeröhrchen einen Einfluss auf die Homocysteinkonzentration hatten, wurden alle Messwerte zum Zeitpunkt 0 miteinander verglichen.

2.2.4.6 Methodenvergleich

Der Methodenvergleich soll zeigen, ob das zu evaluierende Gerät eine gute Korrelation im Vergleich zu bereits erfolgreich in der Routine eingesetzten Geräten/Messmethoden zeigt. Mit dem Immulite 2500, dem ADVIA Centaur und der HPLC wurden 118 Patientenproben im Homocystein-Konzentrationsbereich von $2,8 \mu\text{mol/l}$ bis $38,2 \mu\text{mol/l}$ in Parallelmessungen gemessen. Des Weiteren wurden mit diesen drei Methoden 110 Proben von Dialysepatienten im Homocystein-Konzentrationsbereich von $2,9 \mu\text{mol/l}$ bis $49,8 \mu\text{mol/l}$ in Parallelmessungen gemessen. Die Homocysteinkonzentrationen in den Proben der Dialysepatienten liegen häufig im erhöhten Bereich ($>10 \mu\text{mol/l}$).

2.3 Statistische Methoden

Zur Bestimmung des Mittelwertes, der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten wurde Microsoft Excel 2003 verwendet. Der Methodenvergleich wurde nach Passing/Bablok (Passing/Bablok, 1983) und nach Bland/Altman (Altman/Bland, 1983) ausgewertet.

Bland/Altman ist eine graphische Darstellungsmethode für den Vergleich bzw. die Darstellung der Übereinstimmung zweier Messmethoden. Anders als bei der Berechnung des Korrelationskoeffizienten werden keine Absolutwerte verwendet. Zunächst werden die Differenzen aller Messpaare berechnet und gegen den Durchschnitt der Mittelwerte der Methoden aufgetragen. Aufgrund der Annahme, dass beide Messwerte gleich gut bzw. gleich schlecht sind, wird als der optimale Schätzwert der Mittelwert der beiden Messmethoden gewählt. Hiermit ergeben sich Hinweise auf eventuelle systematische Unterschiede zwischen den beiden Messtechniken. Die mittlere Differenz ergibt die Abweichung (Bias) zwischen den beiden Messmethoden. Für eine ausreichende Messgenauigkeit der Methoden wird gefordert, dass sich die Abweichung des Mittelwerts vom Mittelwert der Summe der Mittelwerte maximal im Rahmen von ± 2 Standardabweichungen (SD) bewegen sollte. Diese Grenzen des Übereinstimmungsbereich (Limits of agreements = LOA) errechnen sich aus:

$\text{LOA 1} = \text{bias} + 2s$ und $\text{LOA 2} = \text{bias} - 2s$.

3 Ergebnisse

3.1 Analytische Evaluierung

3.1.1 Intra-Assay-Präzision

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Intra-Assay-Präzisionsmessungen zusammengefaßt.

Tabelle 5: Intra-Assay-Präzision

	Patienten				Kontrollen	
Homocystein	niedrig	mittel 1	mittel 2	hoch	Level I	Level II
Anzahl Messungen	20	20	20	20	20	20
Mittelwert ($\mu\text{mol/l}$)	3,8	16,8	29,0	42,9	8,5	18,8
SD ($\mu\text{mol/l}$)	0,3	1,0	7,1	2,2	0,4	0,9
VK (%)	7,4	6,3	3,9	5,1	5,4	4,8

Die Variationskoeffizienten (VK) der Homocystein-Messungen der Patientenproben, wie auch die der Kontrollen, liegen alle unter 10% in einem Bereich von 3,9-7,4%.

3.1.2 Inter-Assay-Präzision

Die Messung der Inter-Assay-Präzision wurde an 12 aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Es wurden drei Patientenproben und zwei Kontrollen analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6: Inter-Assay-Präzision

	Patienten			Kontrollen	
Homocystein	niedrig	mittel	hoch	Level I	Level II
Anzahl Messungen	11	12	12	12	12
Mittelwert ($\mu\text{mol/l}$)	4,0	27,7	44,4	8,8	18,2
SD ($\mu\text{mol/l}$)	0,3	2,4	2,3	0,9	1,4
VK (%)	8,0	8,7	5,2	10,4	7,9

Bis auf den Variationskoeffizienten (VK) der Kontrolle Level I, der 10,4% beträgt, liegen alle ermittelten VK unter 10%.

3.1.3 Verdünnungslinearität

Die durchschnittliche prozentuale Abweichung der Werte der 1. Verdünnungsreihe von der jeweiligen vom Gerät berechneten Verdünnung beträgt 14,9% und die der 2. Verdünnungsreihe 9,7% (siehe Tabelle 7). In den Abbildungen 6 und 7 wurden die in den Verdünnungsreihen gemessenen Werte den berechneten Werten gegenübergestellt und die Korrelation ermittelt (R^2).

Tabelle 7: Ergebnisse der Verdünnungsreihen

Errechnete Verdünnung (µmol/l)	45,5	30,3	20,2	13,5	9	6	4	2,7
Gemessener Wert 1. Verdünnungsreihe (µmol/l)	45,5	33,8	22,5	15,7	10,7	6,9	4,9	2,9
Relative Abweichung bezüglich 100% (in %)	-	11,4	11,3	16,5	19	15,5	23,8	7,1
Gemessener Wert 2. Verdünnungsreihe (µmol/l)	45,5	32,4	22,8	14,8	10,4	6,2	4,5	2,8
Relative Abweichung bezüglich 100% (in %)	-	6,8	12,8	9,8	15,7	3,3	12,8	6,8

Abbildung 6: 1. Verdünnungsreihe

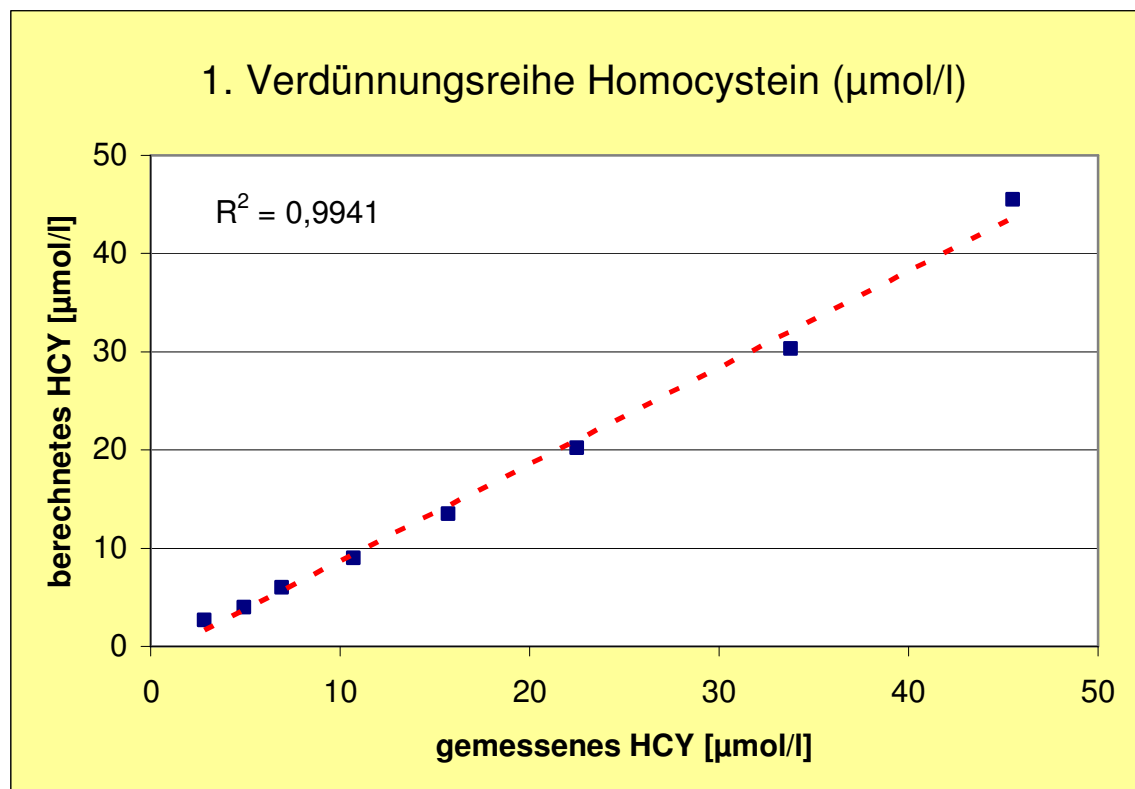
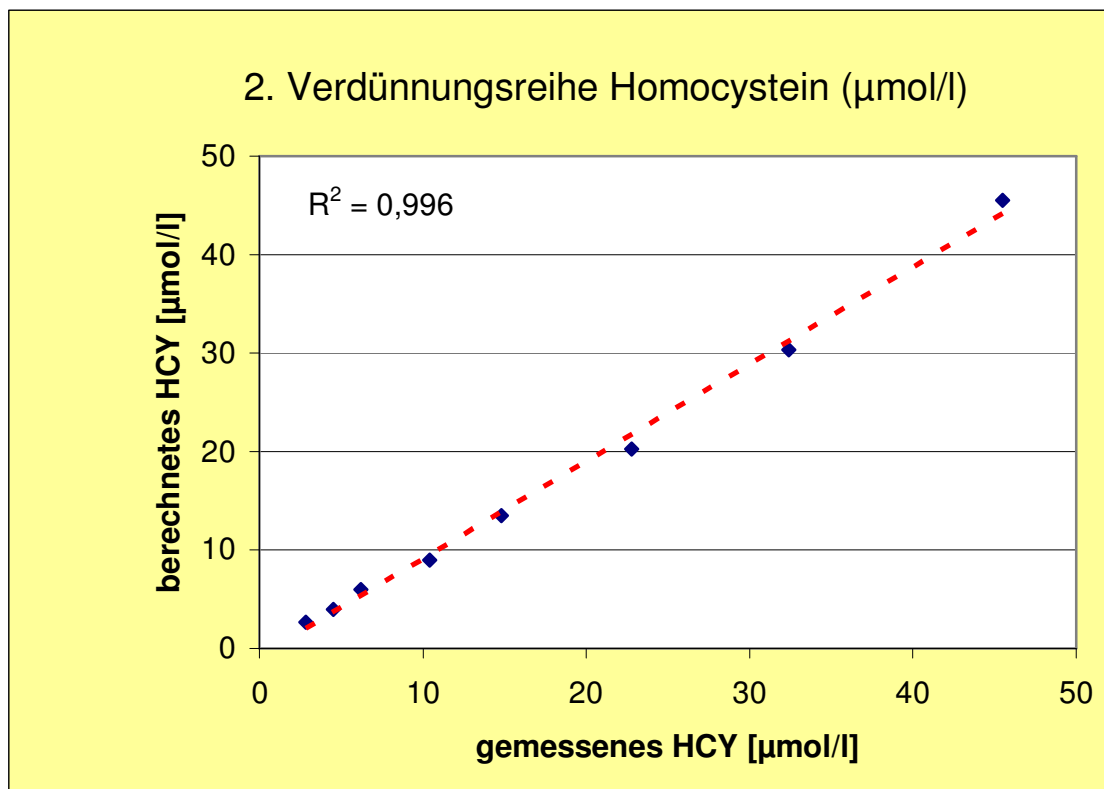


Abbildung 7: 2. Verdünnungsreihe



3.1.4 Verschleppung

Die Ergebnisse der Verschleppung zeigen keine Beeinflussung der Messung der niedrigen Probe durch die vorher analysierte hohe Probe. Es ist kein systematischer Anstieg der niedrigen Probe erkennbar. Die Variationskoeffizienten liegen bei 3,4% (hohe Probe) bzw. 15,6% (niedrige Probe). In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Verschleppungsanalyse zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 8: Ergebnisse der Verschleppung

Messung	Hohe Probe ($\mu\text{mol/L}$)	Niedrige Probe ($\mu\text{mol/L}$)
1	47,0	7,6
2	46,4	7,0
3	43,6	6,3
4	48,5	4,5
5	47,5	5,1
6	45,8	5,6
7	47,6	6,7
8	44,4	6,4
Mittelwert	46,4	6,2

SD	1,57	0,96
VK (%)	3,4	15,6

3.1.5 Stabilität

Im Folgenden sind für die verschiedenen Blutabnahme-Röhrchen jeweils zentrifugiert und nicht zentrifugiert die ermittelten Messwerte nach den festgelegten Zeitpunkten in Tabellenform und in graphischer Form dargestellt. Prinzipiell ist ein deutlicher Anstieg der Homocysteinwerte bei den nicht zentrifugierten Proben zu erkennen.

Es ist zu beachten, dass in den zentrifugierten Heparin-Plasma- und Serum-Proben nach Zentrifugation die Erythrozyten durch eine Gelschicht vom Plasma bzw. Serum getrennt sind, während diese Gelschicht bei den EDTA-Plasma-Proben nicht vorhanden ist.

Die im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen eingesetzten Blutproben waren mit Heparin versetzt. Laut Ducros et al. werden zur Bestimmung der Homocysteinkonzentration jedoch gebräuchlicherweise EDTA-versetzte Blutproben herangezogen (Ducros et al., 2002). Zum Ausschluss eines möglichen Einflusses des Antikoagulanzen auf die Homocysteinkonzentration werden für die Patienten 8-12 sowohl EDTA- als auch Heparin-versetzte Blutproben vergleichend analysiert.

Tabelle 9: Stabilitätsmessung der nicht zentrifugierten Heparin-Plasma-Proben

Heparin-Plasma nicht zentrifugiert	Messzeitpunkt nach Blutabnahme in h								Anstieg HCY nach 24 h	
	0	0,5	1	2	4	6	12	24	in %	in µmol/l
1	6,4	5,8	5,5	5,7	-	7,6	11,1	14,9	133	8,5
2	4,1	4,8	-	4,6	-	6,4	9,3	15,3	273	11,2
3	7,0	7,4	6,8	6,4	-	8,5	11,6	16,2	131	9,2
4	5,8	6,5	6,3	5,9	-	7,7	10,3	15,9	174	10,1
5	5,9	6,1	5,5	6,6	-	7,7	10,6	17,8	202	11,9
6	16,2	16,4	16,2	16,9	-	18,8	22,4	30,2	86	14,0
7	6,8	6,7	6,6	7,6	-	10,2	13,1	12,7	87	5,9
8	7,3	7,3	8,0	8,9	8,1	8,3	9,6	12,9	77	5,6
9	4,2	4,7	4,2	6,1	4,9	6,3	9,7	15,2	262	11,0
10	4,8	5,0	5,1	6,5	6,3	6,5	9,8	13,2	175	8,4
11	3,7	3,1	5,1	3,7	4,7	4,9	6,4	12,9	249	9,2
12	5,9	5,7	5,1	6,1	6,5	6,7	10,6	15,3	159	9,4

Tabelle 10: Stabilitätsmessung der zentrifugierten Heparin-Plasma-Proben

Heparin-Plasma zentrifugiert	Messzeitpunkt nach Blutabnahme in h								Anstieg HCY nach 24 h	
Probe	0	0,5	1	2	4	6	12	24	in %	in $\mu\text{mol/l}$
1	5,5	5,2	4,9	4,3	-	5,2	5,6	6,2	12,7	0,7
2	4,3	3,5	4,0	3,7	-	3,5	3,8	4,3	0,0	0,0
3	7,3	6,6	6,1	6,0	-	5,9	6,3	6,7	-8,2	-0,6
4	6,6	5,5	5,0	5,2	-	5,8	6,1	6,0	-9,1	-0,6
5	6,3	5,3	5,9	5,1	-	6,0	5,9	6,6	4,8	0,3
6	17,0	16,2	15,1	15,6	-	16,7	17,1	19,0	11,8	2,0
7	7,1	6,3	6,5	6,4	-	6,4	6,5	7,5	5,6	0,4
8	7,5	7,0	6,7	7,0	6,5	5,7	6,0	7,4	-1,3	-0,1
9	4,4	4,3	3,7	4,2	3,7	3,2	3,7	4,2	-4,6	-0,2
10	4,7	4,3	4,4	4,1	3,6	4,1	4,0	4,2	-10,6	-0,5
11	-	3,6	3,5	3,0	2,8	3,0	3,7	3,3	-8,3	-0,3
12	5,7	5,8	5,6	4,7	4,6	4,9	5,2	5,7	0,0	0,0

Der durchschnittliche Anstieg der Homocysteinkonzentration der 12 nicht zentrifugierten Heparin-Plasma-Proben beträgt nach 24 Stunden 167%. Das entspricht einem durchschnittlichen Anstieg um 9,5 $\mu\text{mol/l}$. Bei den zentrifugierten Heparin-Plasma-Proben hingegen zeigt sich ein durchschnittlicher Abfall um 0,6%. Die zentrifugierten Proben bleiben in ihrer Homocysteinkonzentration also trotz Lagerung bei Raumtemperatur annähernd konstant. Bei den nicht zentrifugierten Proben ist eine Stunde nach Blutentnahme noch kein Anstieg der Homocysteinkonzentration zu erkennen, die Messergebnisse liegen im Bereich der normalen Messschwankungen. Die ersten sieben Proben zeigen nach zwei Stunden einen durchschnittlichen Anstieg der Homocysteinkonzentration um 3,2%. Nach sechsstündiger Lagerung bei Raumtemperatur ist die Konzentration in Probe 1 bis 7 durchschnittlich um 32% gestiegen. Aufgrund des großen Unterschiedes des ermittelten durchschnittlichen Homocysteinanstiegs zwei bzw. sechs Stunden nach Blutentnahme, wurde bei den Proben 8 bis 12 zusätzlich der 4-Stunden-Wert bestimmt. Der 4-Stunden-Wert zeigt einen durchschnittlichen Anstieg um 19%. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt.

Abbildung 8: Graphische Darstellung der Stabilität nicht zentrifugierter Heparin-Plasma-Proben

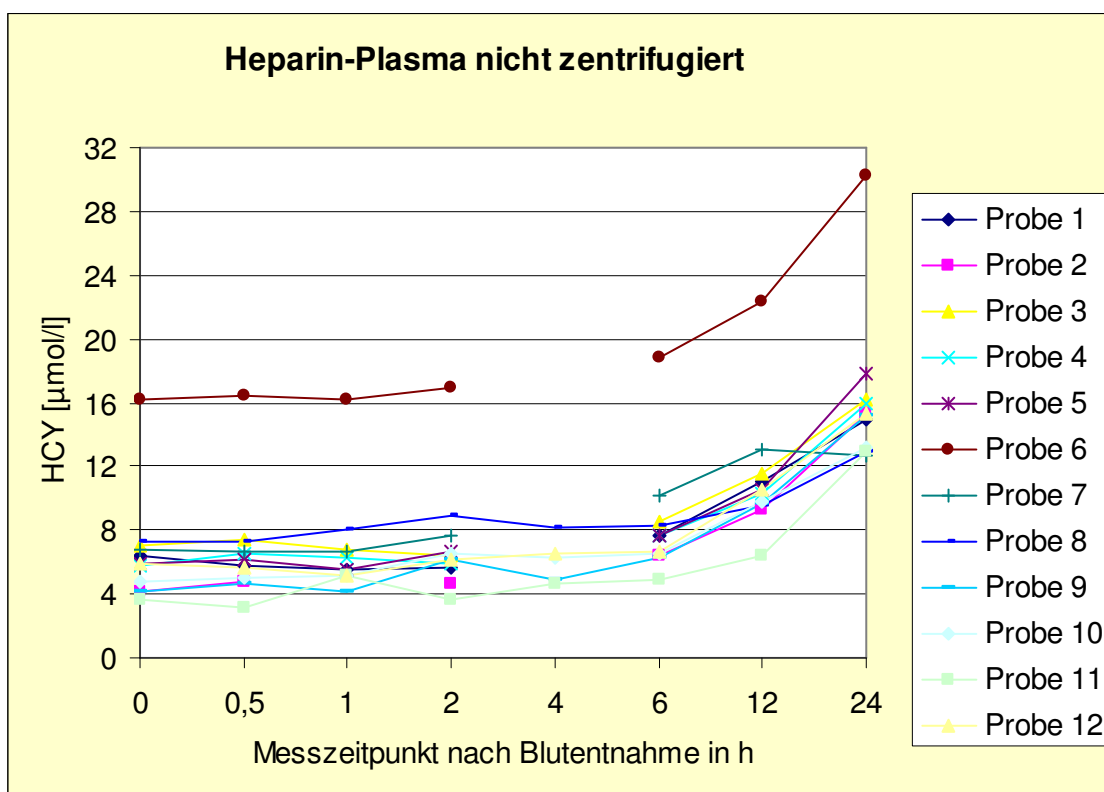


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Stabilität zentrifugierter Heparin-Plasma-Proben

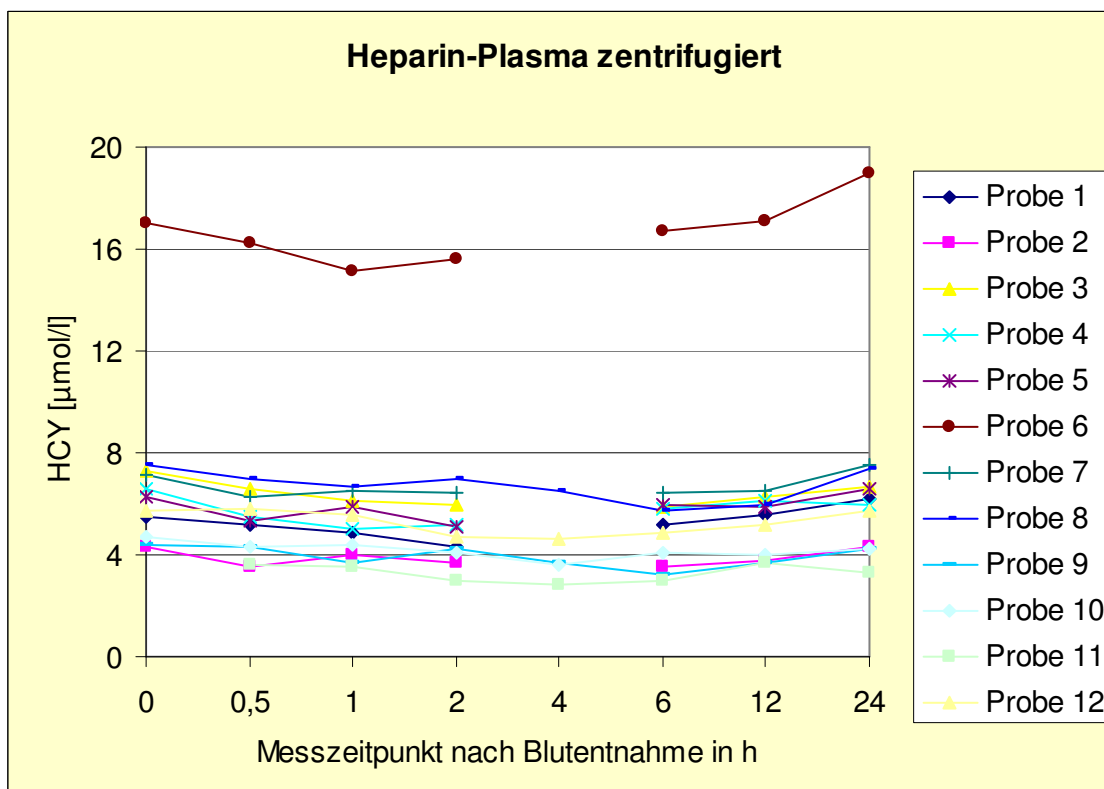


Tabelle 11: Stabilitätsmessung der nicht zentrifugierten Serum-Proben

Serum nicht zentrifugiert	Messzeitpunkt nach Blutabnahme in h								Anstieg HCY nach 24 h	
	0	0,5	1	2	4	6	12	24	in %	in µmol/l
1	4,3	4,3	4,5	3,7	-	6,8	10,6	18,5	330	14,2
2	5,9	5,5	5,0	4,8	-	6,7	9,8	-	66	3,9
3	6,4	6,3	6,8	6,5	-	9,7	15,4	21,8	241	15,4
4	6,4	6,1	6,2	5,6	-	8,7	10,3	17,5	173	11,1
5	5,6	5,9	6,5	6,1	-	8,8	8,7	11,9	113	6,3
6	16,8	17,2	-	17,4	-	19,0	19,8	26,8	60	10,0
7	6,7	6,4	7,0	7,1	-	11,1	11,8	15,3	128	8,6
8	7,3	7,2	7,5	8,7	7,2	7,8	11,1	17,5	140	10,2
9	4,8	4,9	4,6	6,4	5,9	4,8	7,3	13,5	181	8,7
10	4,3	5,1	4,8	6,3	5,2	4,9	7,5	14,2	230	9,9
11	3,3	3,6	3,8	4,0	3,6	4,6	6,8	13,8	318	10,5
12	5,8	5,8	5,5	6,0	6,5	6,2	10,1	16,6	186	10,8

Tabelle 12: Stabilitätsmessung der zentrifugierten Serum-Proben

Serum zentrifugiert	Messzeitpunkt nach Blutabnahme in h								Anstieg HCY nach 24 h	
	0	0,5	1	2	4	6	12	24	in %	in µmol/l
1	5,6	5,6	5,2	4,8	-	5,1	5,7	5,7	1,8	0,1
2	3,9	3,5	3,6	3,0	-	4,0	4,0	4,0	2,6	0,1
3	6,9	6,2	6,2	5,2	-	6,4	6,0	6,7	-2,9	-0,2
4	5,9	5,7	5,6	4,8	-	4,9	5,9	6,5	10,2	0,6
5	6,2	5,3	5,2	5,2	-	6,3	6,1	6,7	8,1	0,5
6	16,2	16,0	16,0	15,7	-	16,0	15,6	17,3	6,8	1,1
7	6,7	6,1	6,3	6,4	-	6,6	6,9	7,5	11,9	0,8
8	7,5	7,1	7,3	7,0	6,2	5,5	5,9	7,2	-4,0	-0,3
9	4,4	4,2	4,0	4,6	3,4	3,2	3,5	3,9	-11,4	-0,5
10	4,5	4,3	4,3	4,8	3,8	3,3	3,9	4,0	-11,1	-0,5
11	3,5	3,4	3,3	3,0	3,0	3,0	2,9	3,6	2,9	0,1
12	5,5	5,5	5,2	5,1	5,2	5,0	6,2	5,4	-1,8	-0,1

Der durchschnittliche Homocysteinanstieg der 12 nicht zentrifugierten Serum-Proben beträgt nach 24 Stunden 181% und liegt damit 13% über dem durchschnittlichen Anstieg der nicht zentrifugierten Heparin-Plasma-Proben. Das entspricht einem durchschnittlichen Konzentrationsanstieg von 10 µmol/l. Der durchschnittliche Anstieg der 12 zentrifugierten Proben beträgt 1,1%. Somit bleiben die zentrifugierten Serum-Proben in ihrem Homocysteingehalt annähernd konstant. Die ersten sieben Proben zeigen zwei Stunden nach Blutentnahme keinen signifikanten Anstieg der Homocysteinkonzentration. Nach sechsständiger Lagerung beträgt der durchschnittliche Homocysteinanstieg 43%. Der in 5 Proben (8 bis 12) ermittelte 4-Stunden-Wert ergab einen durchschnittlichen Anstieg der

Homocysteinkonzentration um 13%. In Abbildung 10 und 11 sind die Messergebnisse graphisch dargestellt.

Abbildung 10: Graphische Darstellung der Stabilität nicht zentrifugierter Serum-Proben

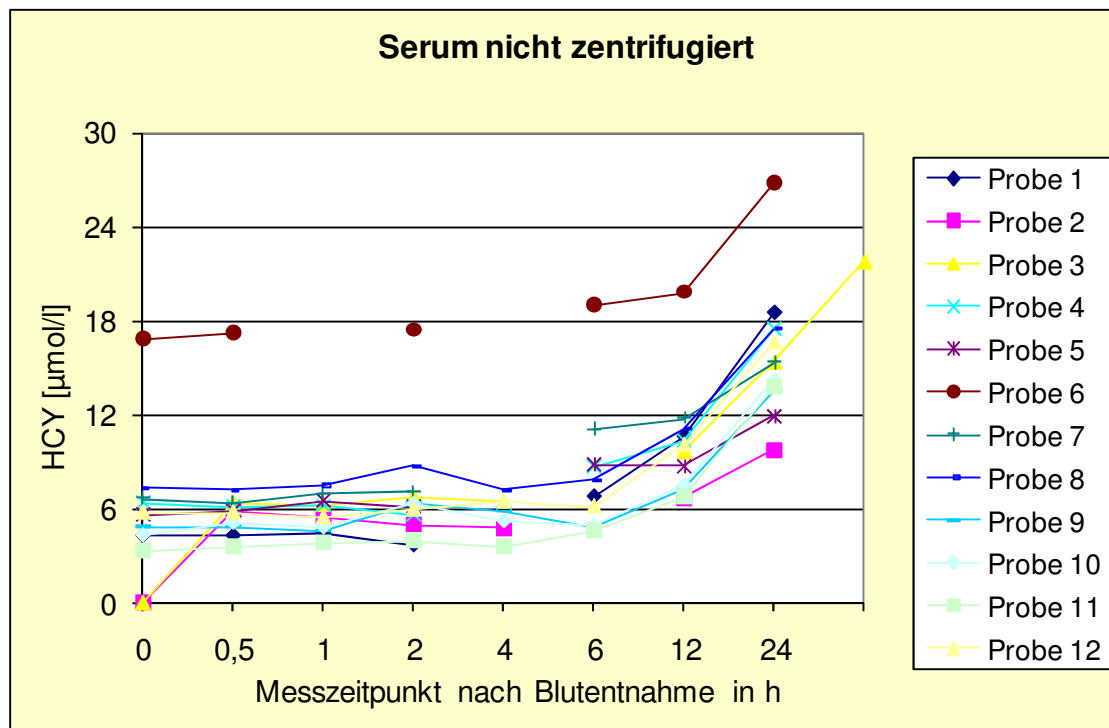


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Stabilität zentrifugierter Serum-Proben

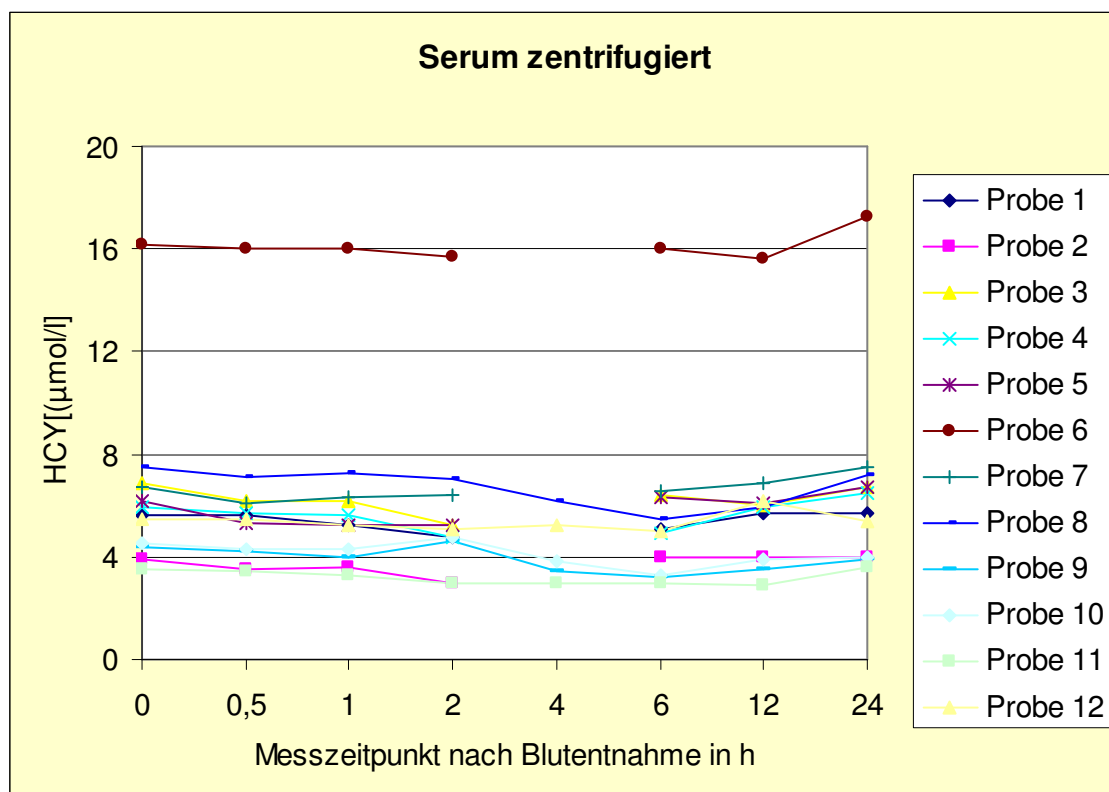


Tabelle 13: Stabilitätsmessung der nicht zentrifugierten EDTA-Plasma-Proben

EDTA-Plasma nicht zentrifugiert	Messzeitpunkt nach Blutabnahme in h								Anstieg HCY nach 24 h	
Probe	0	0,5	1	2	4	6	12	24	in %	in µmol/l
8	6,1	7,2	6,5	8,6	8,1	7,4	11,0	15,0	146	8,9
9	4,2	4,1	4,3	6,1	5,0	6,1	9,2	13,7	226	9,5
10	4,5	4,4	4,2	5,8	4,1	5,6	9,3	13,6	202	9,1
11	3,1	3,3	3,4	3,4	4,3	4,9	7,6	11,6	274	8,5
12	5,2	6,0	4,9	5,6	5,7	7,3	10,9	14,4	177	9,2

Tabelle 14: Stabilitätsmessung der zentrifugierten EDTA-Plasma-Proben

EDTA-Plasma zentrifugiert	Messzeitpunkt nach Blutabnahme in h								Anstieg HCY nach 24 h	
Probe	0	0,5	1	2	4	6	12	24	in %	in µmol/l
8	6,7	7,1	6,7	7,0	5,9	6,5	6,7	8,2	22,4	1,5
9	4,5	4,0	4,2	4,2	3,3	3,9	4,9	5,3	17,8	0,8
10	4,6	4,0	4,1	4,7	3,0	3,6	4,1	5,0	8,7	0,4
11	3,6	2,8	2,7	2,7	3,0	2,8	3,5	4,3	19,4	0,7
12	5,7	5,3	5,6	5,4	4,9	5,6	6,4	7,4	29,8	1,7

Der durchschnittliche Anstieg der Homocysteinkonzentration in den nicht zentrifugierten EDTA-Plasma-Proben beträgt nach 24 Stunden 205%, was einem durchschnittlichen Konzentrationsanstieg um 9,04 µmol/l entspricht. Damit ist der Anstieg 38% höher als der in den nicht zentrifugierten Heparin-Plasma-Proben und 24% höher als der in den nicht zentrifugierten Serum-Proben. Die Messungen des 4-Stunden-Wertes der fünf Proben ergaben einen durchschnittlichen Anstieg der Homocysteinkonzentration von 18%. Die zentrifugierten EDTA-Plasma-Proben zeigen nach 24 Stunden einen durchschnittlichen Anstieg des Homocysteingehaltes von 20% und liegen damit höher als die zentrifugierten Heparin- und Serum-Proben. Dargestellt ist dieses in Abbildung 12 und 13.

Abbildung 12: Graphische Darstellung der Stabilität nicht zentrifugierter EDTA-Plasma-Proben

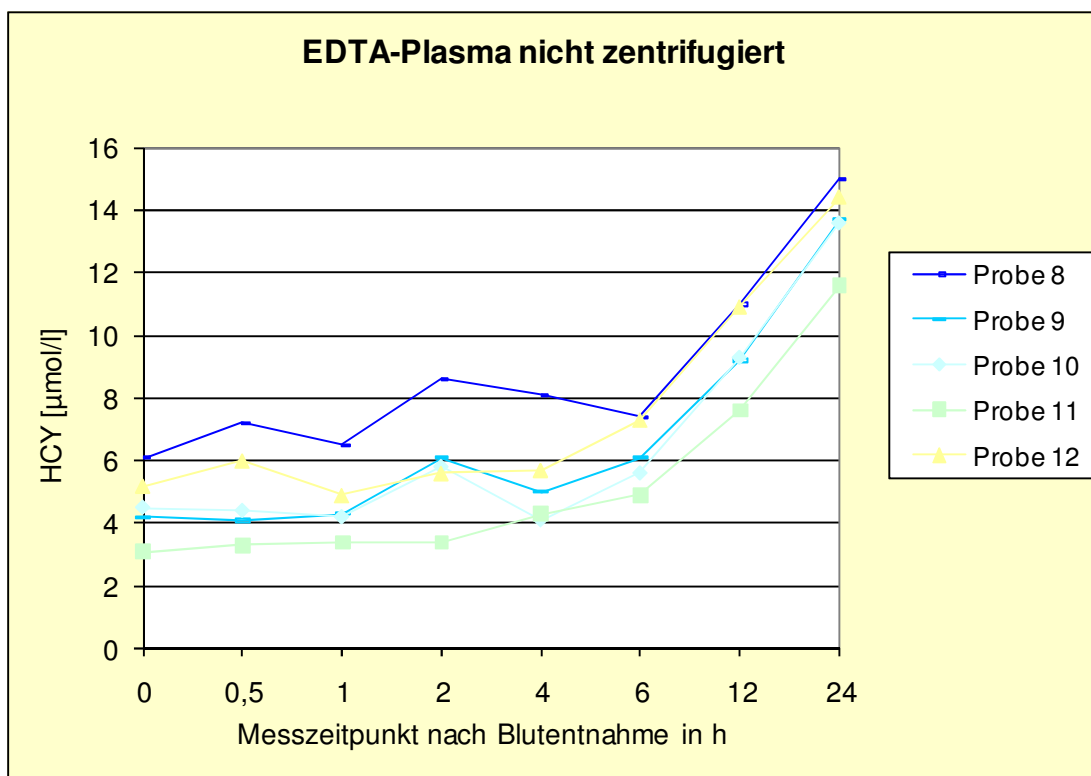
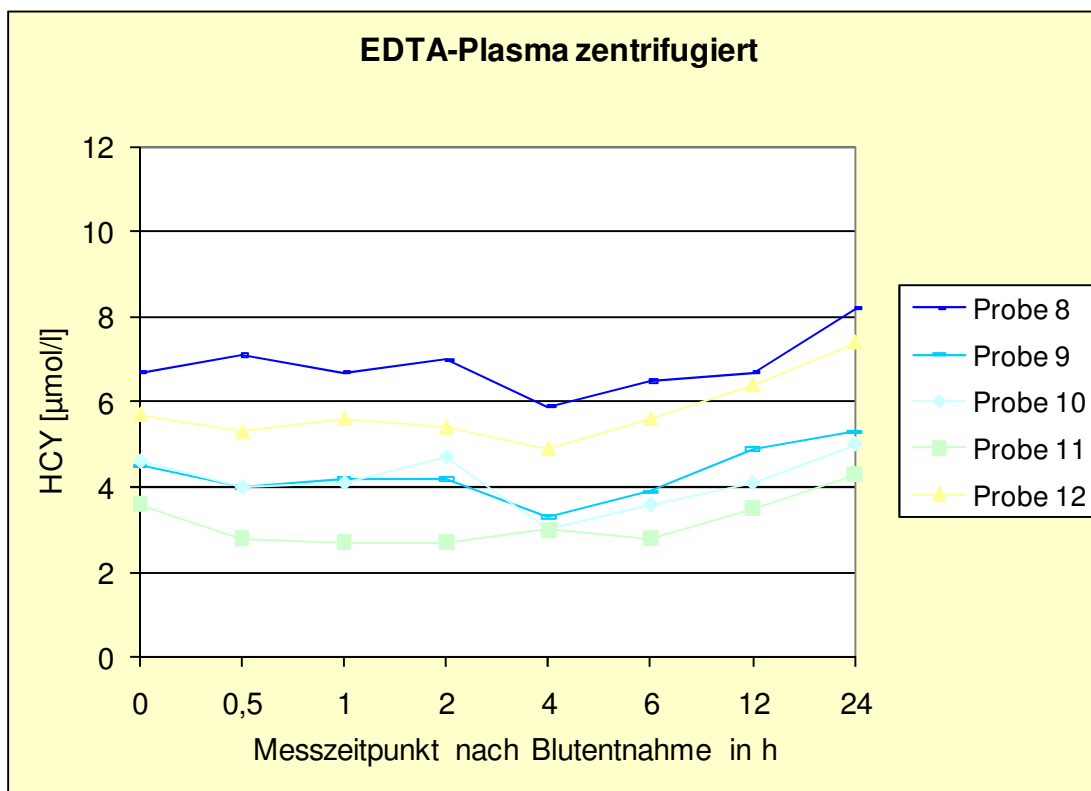


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Stabilität zentrifugierter EDTA-Plasma-Proben



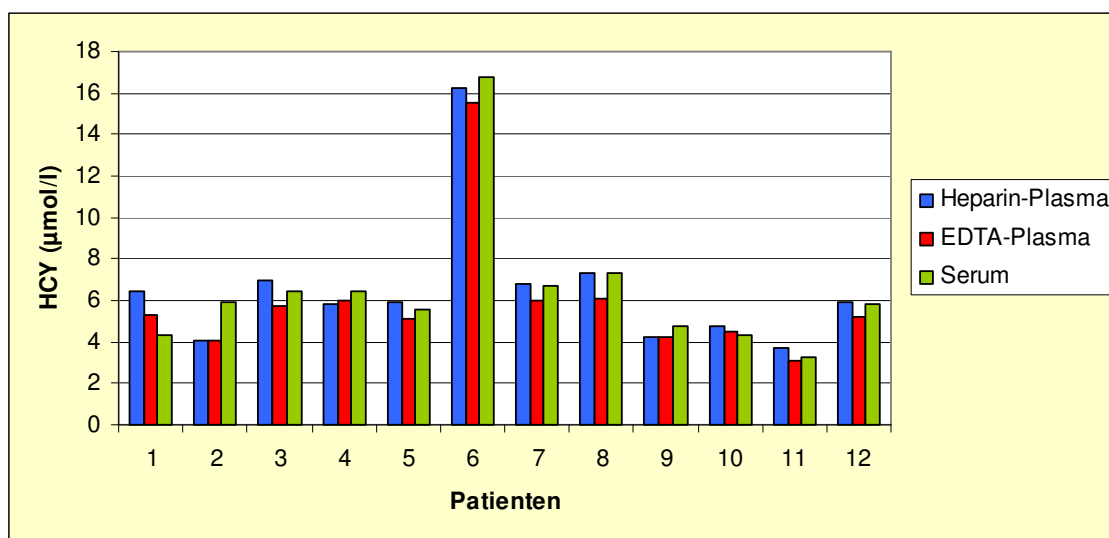
Vergleich der Messwerte in verschiedenen Blutentnahmeröhrchen zum Zeitpunkt Null:

Die folgende Tabelle zeigt die gemessenen Homocysteinkonzentrationen zum Zeitpunkt Null, d.h. nach Blutentnahme und Zentrifugation. Ziel war die vergleichende Betrachtung der Homocysteinkonzentrationen gleicher Patientenproben, die zu diesem Zeitpunkt in verschiedenen Blutentnahmeröhrchen ermittelt wurden.

Tabelle 15: Vergleich der Messwerte in verschiedenen Blutentnahmeröhrchen zum Zeitpunkt 0

Vergleich der Messwerte in verschiedenen Blutentnahmeröhrchen zum Zeitpunkt Null (HCY in $\mu\text{mol/l}$):			
Probe	Heparin-Plasma	EDTA-Plasma	Serum
1	6,4	5,3	4,3
2	4,1	4,1	5,9
3	7,0	5,7	6,4
4	5,8	6,0	6,4
5	5,9	5,1	5,6
6	16,2	15,5	16,8
7	6,8	6,0	6,7
8	7,3	6,1	7,3
9	4,2	4,2	4,8
10	4,8	4,5	4,3
11	3,7	3,1	3,3
12	5,9	5,2	5,8

Abbildung 14: Vergleich der Messwerte in verschiedenen Blutentnahmeröhrchen zum Zeitpunkt 0

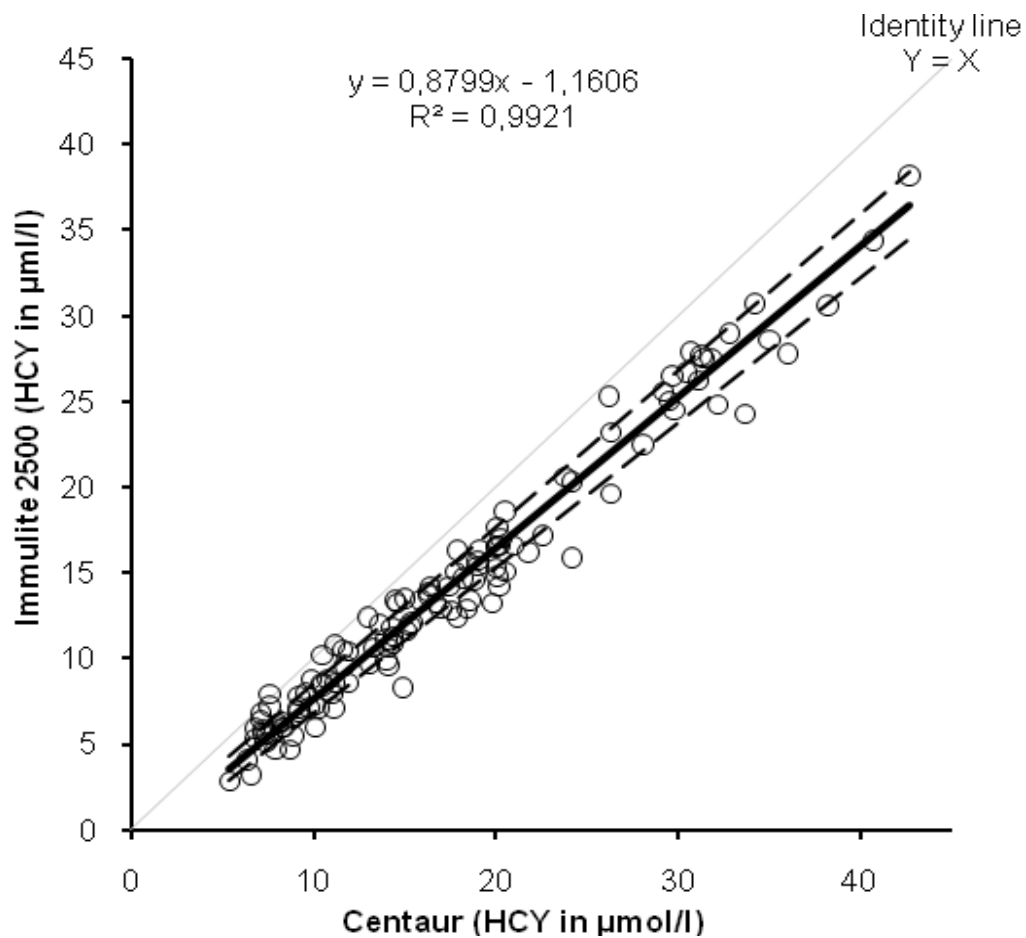


Im Durchschnitt liegen die Homocysteinkonzentrationen in den Heparin-Plasma-Proben und den Serum-Proben annähernd im gleichen Messbereich. Die Homocysteinkonzentrationen der EDTA-Plasma-Proben liegen im Durchschnitt $0,5 \mu\text{mol/l}$ unter denen der Serum-Proben und $0,6 \mu\text{mol/l}$ unter denen der Heparin-Plasma-Proben.

3.1.6 Methodenvergleich

Der Methodenvergleich zwischen dem Immulite 2500 und dem ADVIA Centaur nach Bablok/Passing (Abbildung 15) zeigt einen Korrelationskoeffizienten von $R=0,992$ bei der vergleichenden Messung von 118 Proben aus dem Routinelabor.

Abbildung 15: Methodenvergleich Immulite 2500 und ADVIA Centaur nach Bablok/Passing

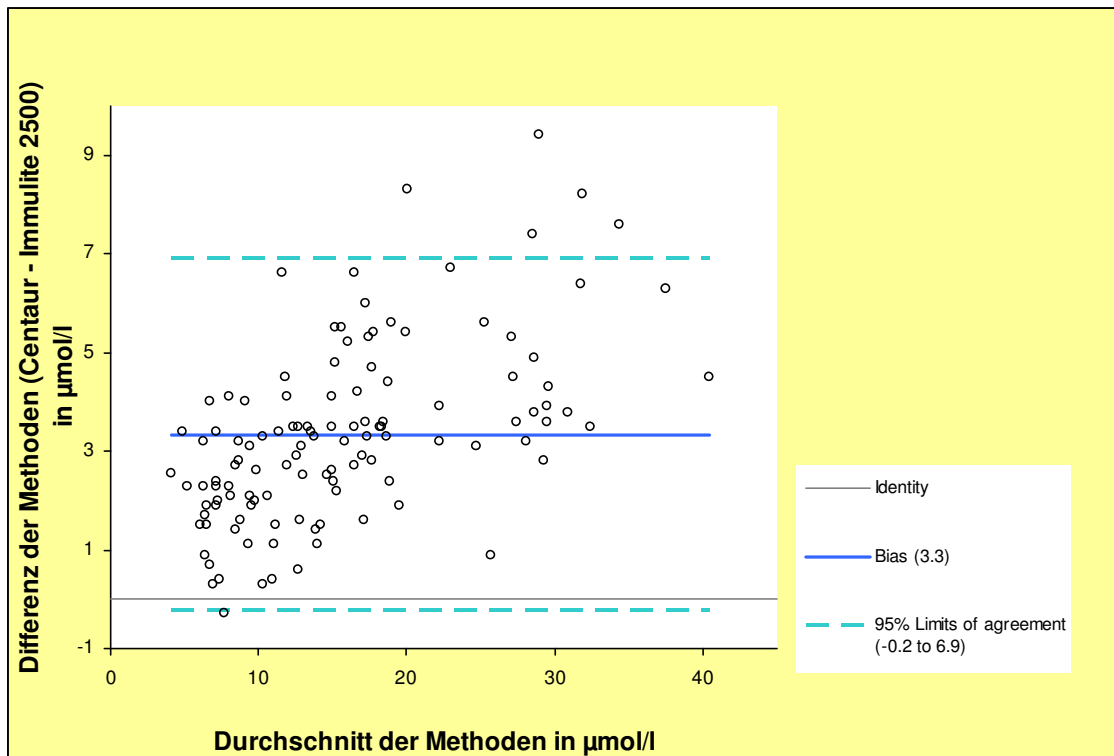


Im Methodenvergleich nach Bland/Altman (Abbildung 16) zeigt sich, dass der ADVIA Centaur die gleichen Proben nahezu ausschließlich höher misst als der Immulite 2500. Es zeigt sich also eine um 3,3 $\mu\text{mol/l}$ ins Positiv verschobene Bias. Da die Abweichung mit zunehmender Konzentration zunimmt, zeigt dies einen proportionalen Fehler. Der Übereinstimmungsbereich (limits of agreement = LOA) mit 95% Wahrscheinlichkeit errechnet sich aus:

$$\text{LOA 1: } d' + 2s = 3,3 + 2 \times 1,8 = 6,9 \mu\text{mol/l}$$

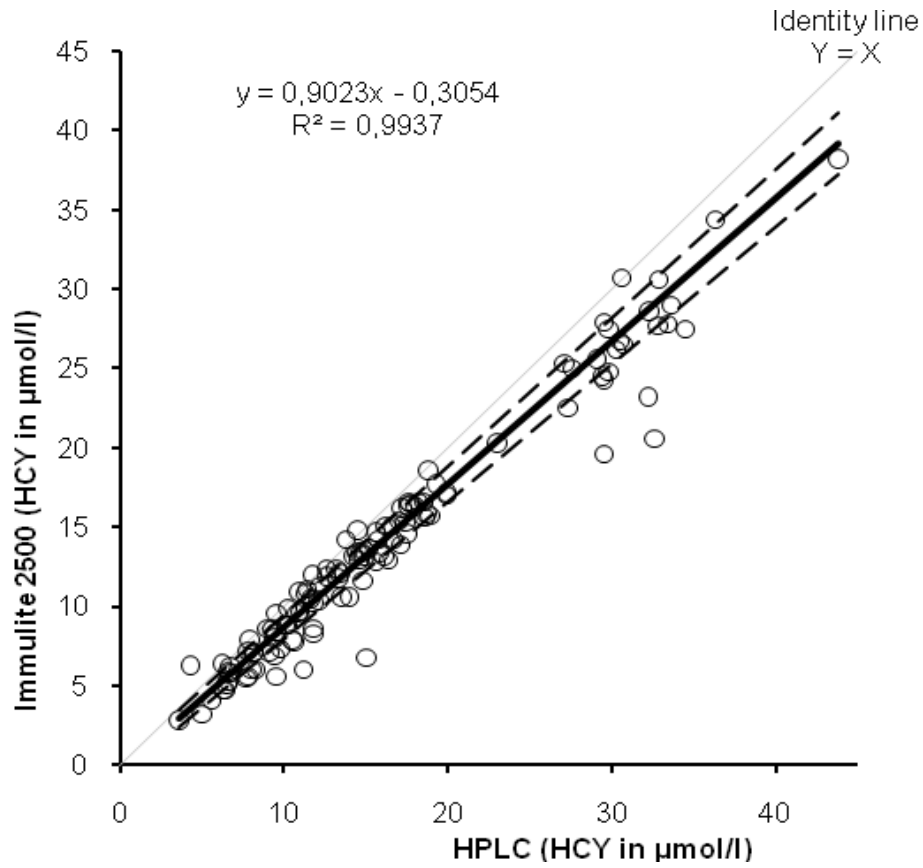
$$\text{LOA 2: } d' - 2s = 3,3 - 2 \times 1,8 = -0,3 \mu\text{mol/l}$$

Abbildung 16: Methodenvergleich Immulite 2500 und ADVIA Centaur nach Bland/Altman



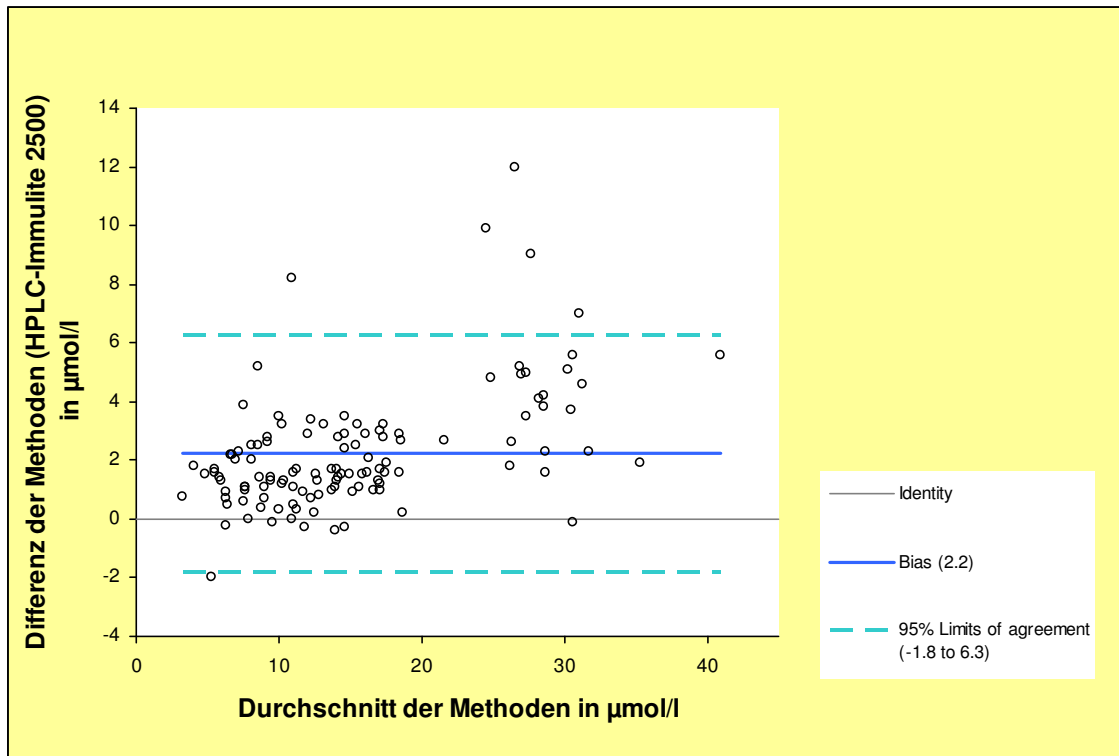
Die Messwerte des Immulite 2500 verglichen mit denen der HPLC korrelieren im Vergleich nach Bablok/Passing ebenfalls gut miteinander (Abbildung 17, $R = 0,994$).

Abbildung 17: Methodenvergleich Immulite 2500 und HPLC nach Bablok/Passing



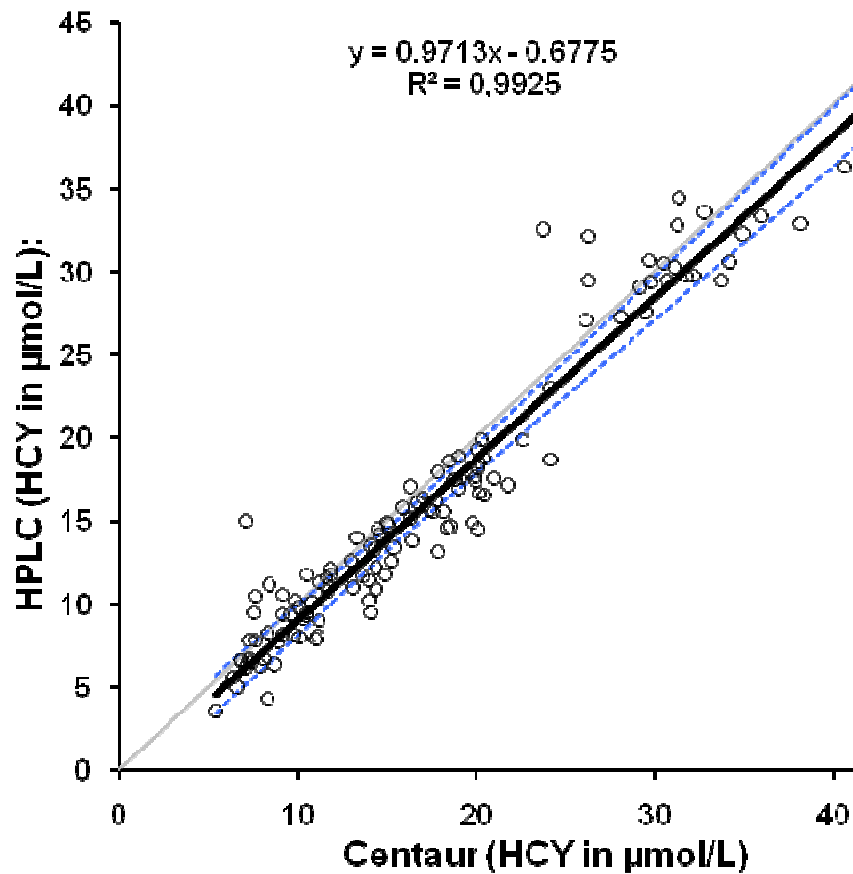
In der Auswertung nach Bland/Altman zeigt sich, dass bei Verwendung der HPLC gleiche Proben höher gemessen werden, als bei Verwendung des Immulite 2500. Auch hier ist die Bias mit 2,2 $\mu\text{mol/l}$ ins Positive verschoben. Die Abweichungen steigen mit höherer Konzentration und zeigen so einen proportionalen Fehler.

Abbildung 18: Methodenvergleich Immulite 2500 und HPLC nach Bland/Altman



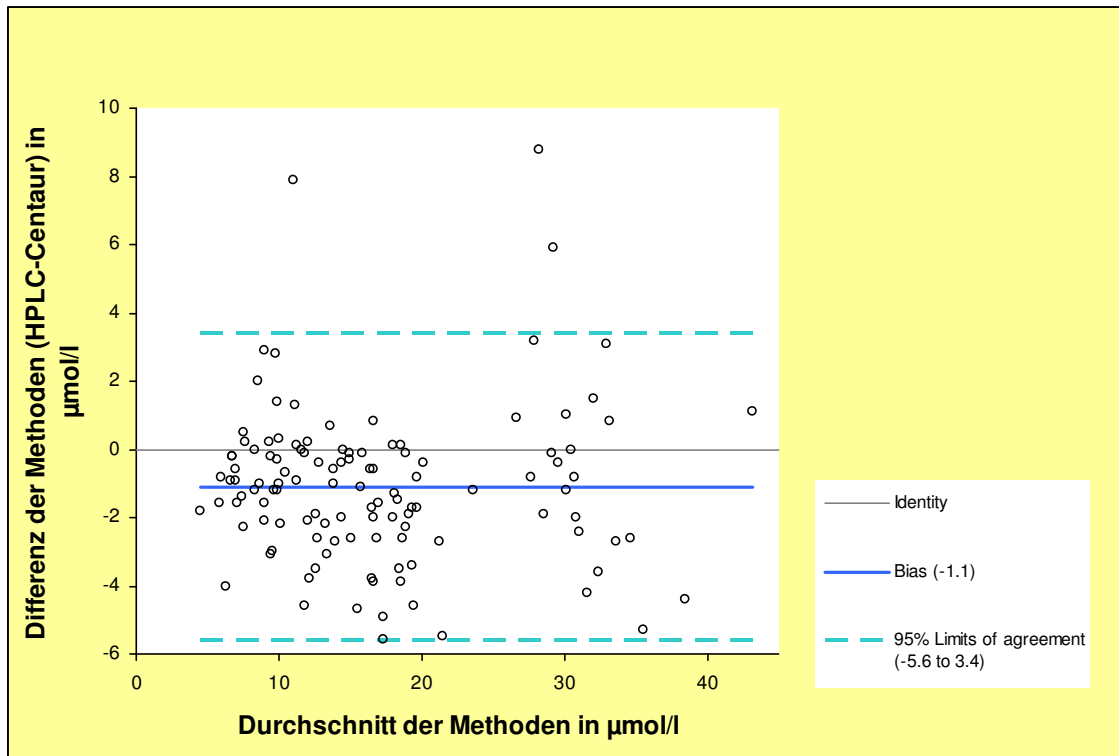
Der Methodenvergleich nach Bablok/Passing ergibt auch für den ADVIA Centaur und die HPLC einen guten Korrelationskoeffizienten von $R=0,993$ (Abbildung 19).

Abbildung 19: Methodenvergleich ADVIA Centaur und HPLC nach Bablok/Passing



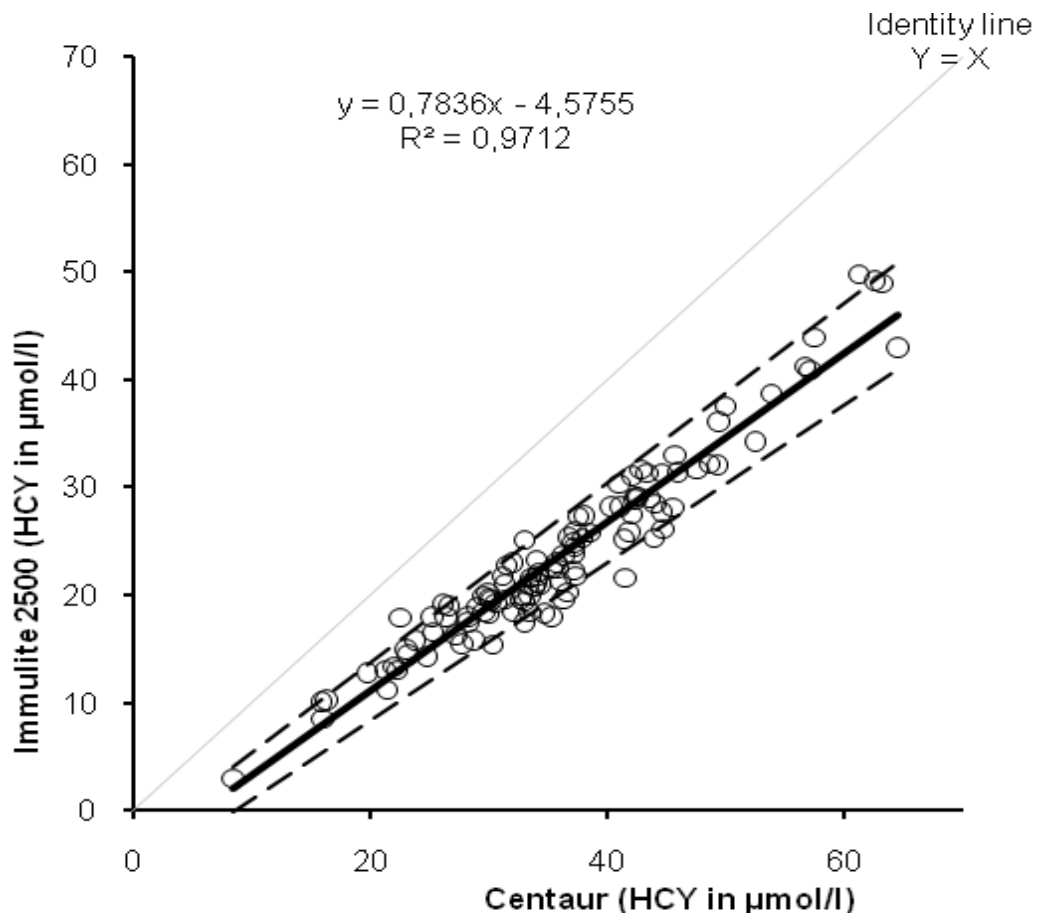
In der Auswertung nach Bland/Altman zeigt sich, dass der Centaur gleiche Proben im Durchschnitt etwas höher misst als die HPLC. Die Bias ist mit $-1,1 \mu\text{mol}$ etwas ins Negative verschoben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

Abbildung 20: Methodenvergleich ADVIA Centaur und HPLC nach Bland/Altman



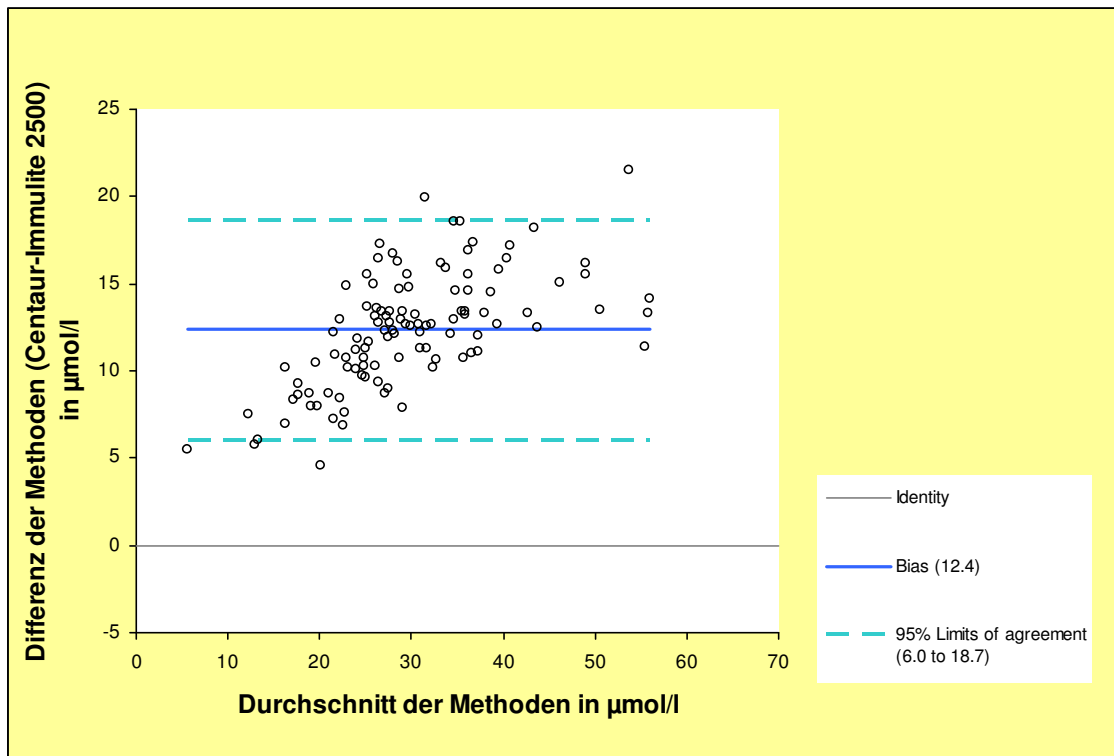
Der Methodenvergleich nach Bablok/Passing anhand von Dialysepatientenproben weist ebenfalls eine gute Korrelation auf. Sie liegt im Vergleich der Messwerte vom Immulite 2500 mit dem ADVIA Centaur bei $R = 0,971$ (Abbildung 21).

Abbildung 21: Methodenvergleich Immulite 2500 und ADVIA Centaur anhand von Dialysepatientenproben nach Bablok/Passing



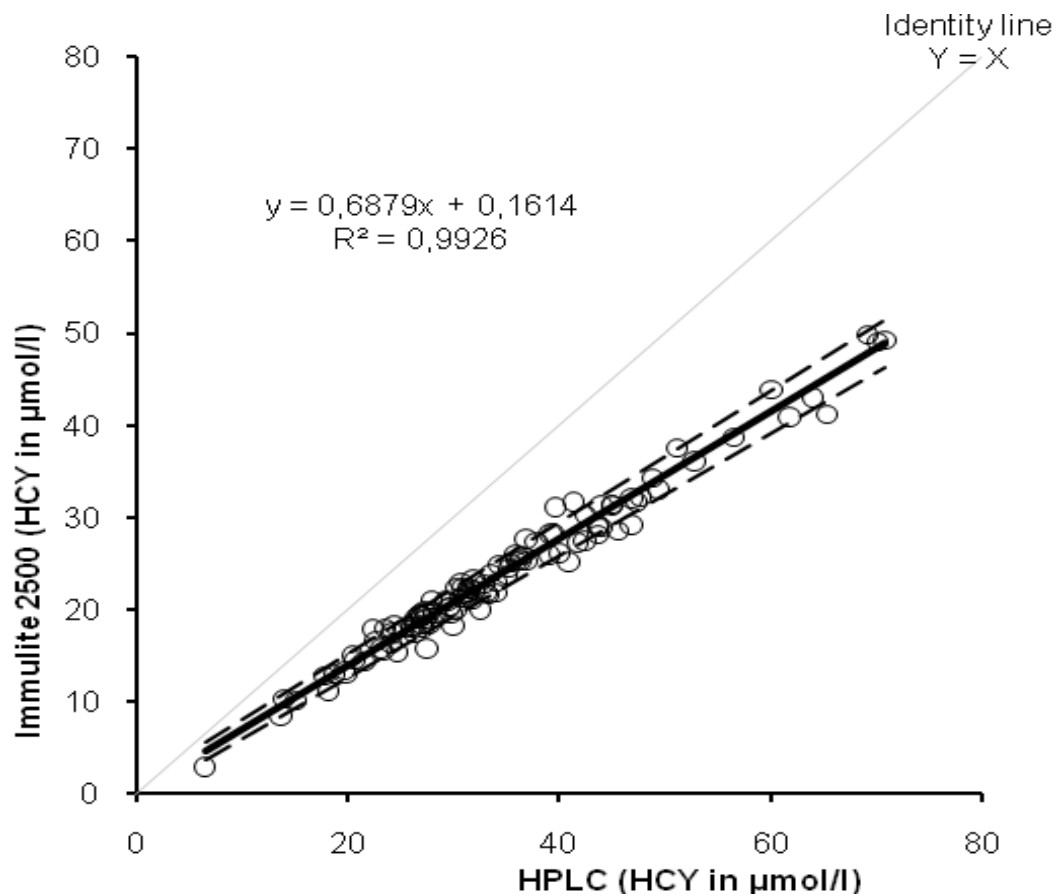
In der Auswertung nach Bland/Altman zeigt sich, dass der ADVIA Centaur die Dialysepatientenproben deutlich höher misst als der Immulite 2500 (Abbildung 22). Die Bias ist somit mit 12,4 $\mu\text{mol/l}$ deutlich in den positiven Bereich verschoben. Auch bei diesen Proben ist die Abweichung mit steigender Konzentration höher, so dass ein proportionaler Fehler vorliegt.

Abbildung 22: Methodenvergleich Immulite 2500 und ADVIA Centaur anhand von Dialysepatientenproben nach Bland/Altman



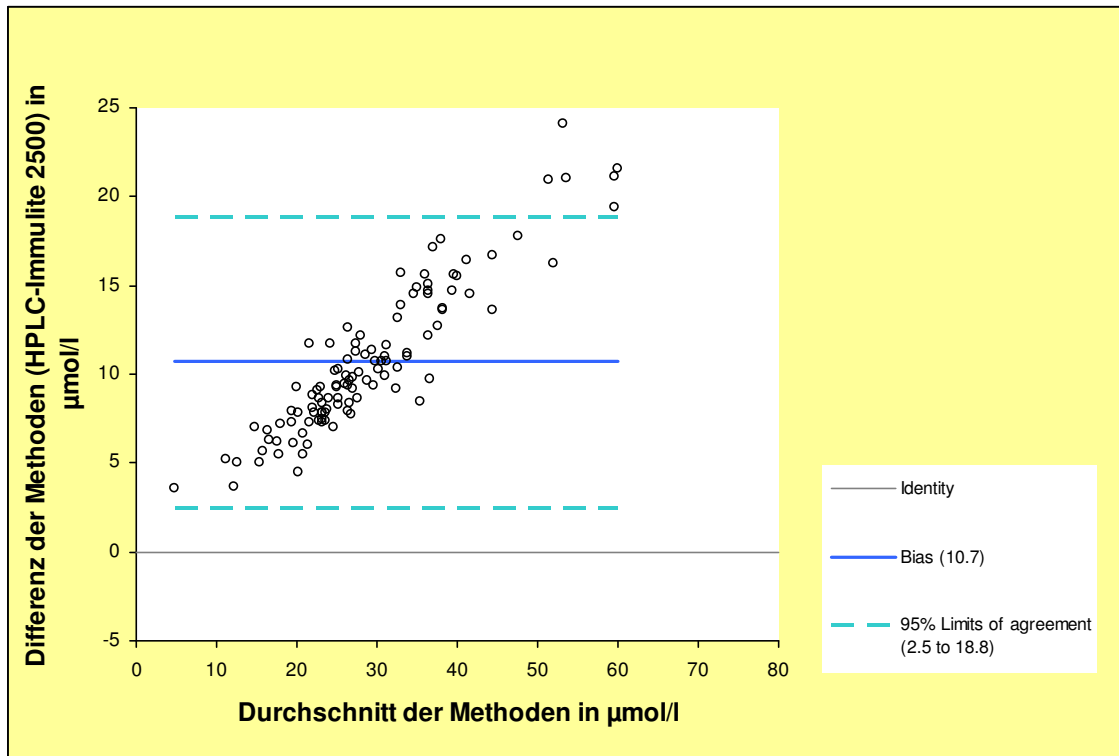
Im Vergleich der Messwerte vom Immulite 2500 und der HPLC liegt der Korrelationskoeffizient bei 0,993 (Abbildung 23). Somit zeigt der Immulite 2500 mit den verglichenen Testverfahren auch bei der Messung von Dialysepatientenproben eine gute Korrelation.

Abbildung 23: Methodenvergleich Immulite 2500 und HPLC anhand von Dialysepatientenproben nach Bablok/Passing



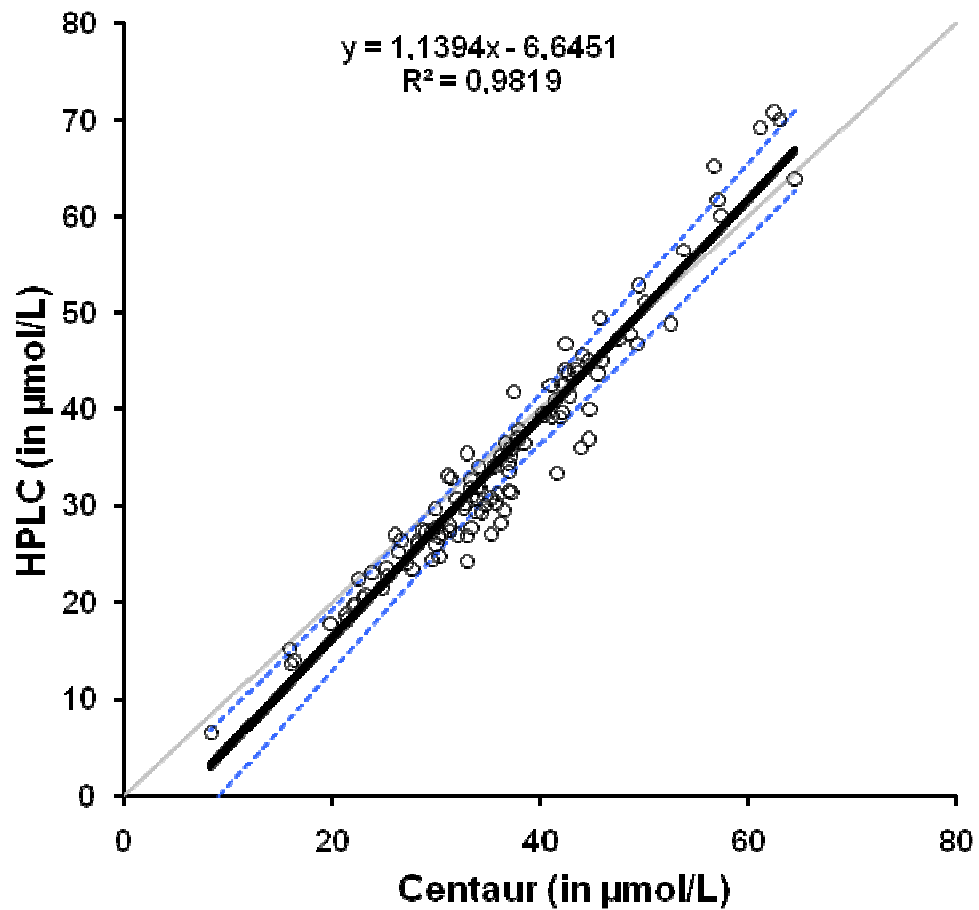
In den Proben von Dialysepatienten wird durch die HPLC ausnahmslos eine höhere Homocysteinkonzentration ermittelt, als durch die Messung am Immulite 2500 (Abbildung 24). Auch hier steigt die Abweichung mit zunehmender Konzentration, was einen proportionalen Fehler zeigt.

Abbildung 24: Methodenvergleich Immulite 2500 und HPLC anhand von Dialysepatientenproben nach Bland/Altman



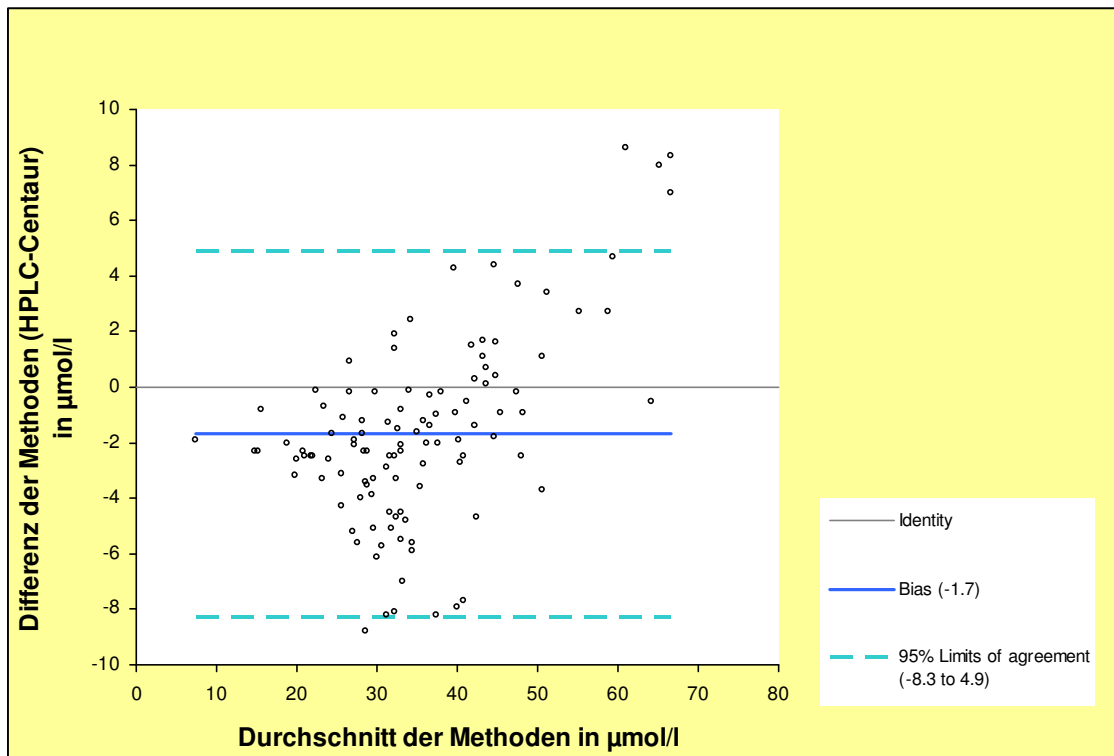
Der Vergleich des ADVIA Centaur mit der HPLC zeigt einen Korrelationskoeffizienten von $R=0,982$ (Abbildung 25).

Abbildung 25: Methodenvergleich ADVIA Centaur und HPLC anhand von Dialysepatientenproben nach Bablok/Passing



Der ADVIA Centaur misst gleiche Proben minimal höher als die HPLC (Abbildung 26). Die Bias ist hier mit $-1,7 \mu\text{mol/l}$ nur gering in den negativen Bereich verschoben.

Abbildung 26: Methodenvergleich ADVIA Centaur und HPLC anhand von Dialysepatientenproben nach Bland/Altman



3.2 Aufgetretener Fehler beim Immulite 2500 Homocystein-Assay

Während der Messungen der Proben mit dem Immulite 2500 fiel auf, dass zunehmend falsch niedrige Homocysteinspiegel verschiedener Proben ermittelt wurden. Ursache hierfür war ein nach der automatischen Vorbehandlung der Probe im Immulite 2500 aufgetretener Pipettierfehler. Im Zusammenhang mit dem Pipettierschritt nach der automatischen Vorbehandlung kam es zu einem Pipettierfehler beim Einbringen der vorbehandelten Probe in das Reaktionsröhrchen des Homocystein-Assays. Es wurde hierbei ein Mindervolumen pipettiert, sodass die Homocysteinkonzentration der Probe falsch niedrig gemessen wurde oder sogar unter der Nachweisgrenze von $<2 \mu\text{mol/l}$ lag. Dieser Steuerungsfehler der Software trat ausschließlich beim Homocystein-Assay auf und nur, wenn das Gerät während der laufenden Messungen in den Probenpausemodus versetzt wurde. Im Oktober 2004 wurden aufgrund des Fehlers alle Homocystein-Assays von DPC Biermann zurückgerufen.

Eine korrigierte Software für den Homocystein-Assay wurde anschließend von der Firma schnellstmöglich zur Verfügung gestellt. Mit dieser korrigierten Software trat der beschriebene Fehler nicht wieder auf.

4 Diskussion

4.1 Homocystein als Risikofaktor

Homocystein ist ein relativ „neuer“ Risikofaktor im Bereich der Herz-Kreislaufkrankungen. Mittlerweile gibt es zahlreiche Studien, die beschreiben, dass Homocystein ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen sowie für die Gesamtmortalität ist (Boushey et al., 1995; Wald et al., 2002; Gravina-Taddei et al., 2005; Stampfer et al., 1992). Nach Schätzung einer Meta-Analyse, die 27 Studien zusammenfasst, lassen sich etwa 10% des Bevölkerungsrisikos für kardiovaskuläre Erkrankungen auf erhöhte Homocysteinwerte zurückführen (Boushey et al., 1995).

Es konnte ein Zusammenhang zwischen Hyperhomocysteinämie und venöser Thrombose (Bienvenu et al., 1993; Tsai et al., 2003), Diabetes (Stehouwer et al., 1999; Hoogeveen et al., 2000), Alzheimer und vaskulärer Demenz (Quadri et al., 2005; Seshadri et al., 2002), Neuralrohrdefekten (Rosenquist et al., 1996; Mills et al., 1995) und Osteoporose (McLean et al., 2004; van Meurs et al., 2004) hergestellt werden. Dennoch ist die genaue Rolle, die Homocystein in diesen Erkrankungen spielt, nicht ausreichend geklärt.

Neben der Bedeutung als Risikofaktor, ist Homocystein ein sensitiver Parameter für Folsäure-, Vitamin B₁₂- und Vitamin B₆-Mängel und die Darstellung des Therapieverlaufes (Refsum et al., 2004; Clarke et al., 1998; Nygard et al., 1998). Ein wichtiger Punkt ist die Kostensenkung für das Gesundheitssystem, die durch eine Verringerung der Homocysteinkonzentration laut der D.A.CH.-Liga Homocystein erreicht werden könnte. Demnach könnte eine effektive Senkung erhöhter Plasmahomocysteinwerte um 3-5 µmol/l durch adäquate Vitaminergänzung eine generelle Reduktion des relativen Risikos für Herz-Kreislaufkrankungen um etwa 10% bewirken, in Hochrisikogruppen sogar bis zu 20% (Stanger et al., 2003). In den USA wurden nach Anreicherung der Nahrung mit Folsäure 26.696 weniger Todesfälle durch Myokardinfarkte oder zerebralen Insult im Vergleich zum Vorjahr registriert (Wilcken and, 1997). Die Homocysteinkonzentrationssenkung durch Vitaminsubstitution ist eine kostengünstige und effektive Möglichkeit zur Reduktion von Morbidität und Mortalität und der damit verbundenen Kosten für das Gesundheitssystem (Clarke and, 1998; Willems et al., 2002). Gegenwärtig ist der in diesem Zusammenhang effizienteste Weg die Identifizierung von Hochrisikogruppen und deren Behandlung (Willems et al., 2002; Wilson et al., 1999).

Eine Homocystein-Konzentrationsbestimmung sollte folgenden Gruppen vorbehalten werden (Refsum et al., 2004):

- Patienten mit Symptomen oder dem Risiko eines Folsäure- und/oder Vitamin B₁₂- Mangels (Patienten mit psychiatrischen Erkrankungen, kognitiven Beeinträchtigungen oder Demenz, Menschen über 75 Jahre, Schwangere mit Komplikationen in der Schwangerschaft, Neugeborene mit erhöhtem Risiko für einen Vitamin B₁₂-Mangel)
- Patienten, die aufgrund eines Folsäure- und/oder Vitamin B₁₂-Mangels behandelt werden (Verlaufskontrolle)

- Patienten mit Symptomen einer Homocystinurie (Kinder oder junge Erwachsene mit ungeklärten thrombotischen Vorfällen, Gedeihungsstörungen, mentaler Retardierung, psychiatrischen Erkrankungen, Linsen-Dislokation, fortschreitender Myopie u.a.)
- Geschwister oder Kinder von Patienten mit Homocystinurie
- Patienten mit Homocystinurie

4.2 Analytische Evaluierung

Jeder Assay, der in die Routinediagnostik eingeführt werden soll, sollte bestimmte Standards erfüllen. Die Messabweichungen zwischen den unterschiedlichen Methoden sind laut der D.A.CH.-Liga Homocystein zu hoch. Zur besseren Vergleichbarkeit der Labors und zur Erhöhung der Qualität der Messergebnisse sollte eine internationale Standardisierung stattfinden (Stanger et al., 2003).

In dem Artikel „*Facts and Recommendations about Total Homocysteine Determinations: An Expert Opinion*“ werden Empfehlungen zum Umgang mit Homocystein im Routinelabor sowie in der Forschung gegeben (Refsum et al., 2004). Als Anforderungen an einen Homocystein-Assay für den Gebrauch im Routinelabor werden hier folgende Punkte genannt:

- Der Assay sollte kosteneffektiv, schnell, robust, leicht zu handhaben und über längere Zeit stabil sein.
- Die Richtigkeit sollte >90% und die Präzision >95% sein.
- Der Messbereich sollte die 0,5te bis 99,5te Perzentile der Allgemeinbevölkerung abdecken (ca. 3 bis 40 $\mu\text{mol/l}$).
- Die Teilnahme an externen Qualitätskontrollen wird empfohlen.

Da die Richtigkeit der Messung des Gesamt-Homocysteins je nach Methode und Labor sehr unterschiedlich ausfällt, ist laut den Experten Vorsicht geboten beim Vergleich von Werten, die in verschiedenen Labors erhoben wurden (Refsum et al., 2004).

4.2.1 Standardisierung des Assays

Die ideale Standardisierung eines Assays würde bedeuten, dass gleiche Proben, gemessen mit unterschiedlichen Homocystein-Assays bzw. an verschiedenen Analysegeräten, zu annähernd identischen Ergebnissen führen.

Methodenvergleich:

Die Korrelationen zwischen den für den Methodenvergleich verwendeten Assays waren durchgehend zufriedenstellend. Sie lagen bei $R=0,992$ und $R=0,994$. Auch die

Methodenvergleiche unter Verwendung von Dialysepatientenproben zeigten gute Korrelationskoeffizienten von $R=0,971$ und $R=0,992$. Der Immulite 2500 liefert somit im Vergleich mit dem ADVIA Centaur und der HPLC gute Ergebnisse. Der Methodenvergleich nach Bland/Altman zeigte allerdings, dass sowohl der ADVIA Centaur als auch die HPLC im Vergleich zum Immulite 2500 bei der Messung identischer Proben höhere Ergebnisse erzielt. Es fällt auf, dass vor allem im Bereich höherer Konzentrationen die Abweichungen zunehmen, was einen proportionalen Fehler demonstriert. Dieses muss bei der Beurteilung und dem Vergleich von Messwerten, die an verschiedenen Geräten ermittelt wurden, beachtet werden.

4.2.2 Präzision des Assays

Intra-Assay-Präzision:

Die Variationskoeffizienten der Intra-Assay-Präzisionsmessungen liegen im Durchschnitt bei 5,5%. Am höchsten ist der Variationskoeffizient der niedrigen Probe (Mittelwert $3,8 \mu\text{mol/l}$). Er liegt bei 7,4%. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Immulite 2500 Homocystein-Assay die gemessenen Werte in wiederholten Messungen gut reproduziert.

Inter-Assay-Präzision:

Auch die Variationskoeffizienten der Inter-Assay-Präzision zeigten gute Werte. Sie liegen im Durchschnitt bei 8,0%. Den höchsten Variationskoeffizienten zeigt die Kontrolle Level 1 (Mittelwert $8,8 \mu\text{mol/l}$) mit 10,4%. Sowohl Proben mit niedrigerer Homocysteinkonzentration, wie auch Proben höherer Konzentration zeigten niedrigere Variationskoeffizienten, so dass es keine speziellen Messungenauigkeiten im unteren oder oberen Messbereich zu geben scheint. Auch die Messergebnisse der täglichen Messung gleicher Proben sind durch den Immulite 2500 Homocystein-Assay gut reproduzierbar.

Verdünnungslinearität:

Die durchschnittliche prozentuale Abweichung der zwei Verdünnungsreihen von der berechneten Verdünnung beträgt 14,9% und 9,7%. Die höchste prozentuale Abweichung liegt bei 23,8%. Hierbei handelt es sich nicht um einen Pipettierfehler, da die nachfolgende Verdünnungsstufe nur eine prozentuale Abweichung von 7,1% zeigt, und ein Pipettierfehler sich in der weiteren Verdünnung fortsetzen müsste. In den zwei Verdünnungsreihen ist weder im stark verdünnten noch im wenig verdünnten Bereich eine ungewöhnlich große Erhöhung der prozentualen Abweichungen zu erkennen.

Verschleppung:

Der Variationskoeffizient der in der Verschleppung gemessenen hohen Probe liegt bei 3,4% und der der niedrigen Probe bei 15,6%. Es ist jedoch kein Anstieg der niedrigen Probe im Laufe der abwechselnden Messung mit der hohen Probe erkennbar. Die Pipettievorgänge des

Immulite 2500 sind demzufolge nicht von einer Verschleppung der hohen in die niedrige Probe begleitet.

4.2.3 Präanalytische Variabilität

Zur möglichst optimalen Behandlung der Patientenproben empfiehlt die D.A.CH.-Liga Homocystein bei der Plasma-Homocystein-Bestimmung folgende Punkte zu beachten (Stanger et al., 2003):

- Verwendung von Nüchternblut
- Verwendung von EDTA-Röhrchen
- Möglichst zeitnahe Zentrifugation nach der Blutentnahme
- Lagerung auf Eis nicht länger als eine Stunde nach Blutentnahme
- Ohne Zentrifugation und bei Aufbewahrung der Probe bei Zimmertemperatur erfolgt eine schnelle Zunahme der Homocysteinkonzentration
- Im Kühlschrank Lagerung des Serum/Plasma bis zu einer Woche
- Eingefroren Lagerung des Serum/Plasma bis zu mehreren Monaten
- Möglichst keine Verwendung von Serum, da Blut zur Serumgewinnung erst nach vollständiger Gerinnung zentrifugiert werden kann
- Die intraindividuelle Variabilität des Homocysteins ist sehr gering

Stabilitätsmessungen:

Im Zuge dieser Doktorarbeit wurde überprüft, inwieweit das Zentrifugieren der Proben, die Verwendung unterschiedlicher Blutentnahme-Röhrchen und die 24-stündige Lagerung der Proben bei Raumtemperatur Einfluss auf die ermittelte Homocysteinkonzentration nehmen.

In den Stabilitätsmessungen zeigt sich bei Verwendung von nicht zentrifugierten Heparin-Plasma-Proben und Aufbewahrung unter Zimmertemperatur ein durchschnittlicher Anstieg der Homocysteinkonzentration um 167%. Bei den zentrifugierten Heparin-Plasma-Proben zeigt sich ein durchschnittlicher Abfall um 0,6%. Die Serum-Proben verzeichnen einen durchschnittlichen Anstieg der Homocysteinkonzentration im unzentrifugierten Zustand um 181% und zentrifugiert um 1,1%. Die unzentrifugierten EDTA-Plasma-Proben steigen im Homocysteingehalt durchschnittlich um 205% und im zentrifugierten Zustand durchschnittlich um 20% an.

Der ausgeprägte, durchschnittliche Anstieg der Homocysteinkonzentration in unzentrifugierten Proben ist deutlich erkennbar. Eine Verwendung von unzentrifugierten Proben zur Bestimmung der Homocysteinkonzentration liefert folglich falsch hohe Werte und sollte vermieden werden. Bei den durchgeführten Messungen fand ein signifikanter Anstieg der Homocysteinkonzentration (um 5-7%) in dem Zeitraum zwischen zwei und vier Stunden nach Blutentnahme statt. Vier Stunden nach Blutentnahme lag der Anstieg der Homocysteinkonzentration jedoch bereits zwischen 13 und 19%. Zwei Stunden nach

Blutentnahme war noch kein signifikanter Anstieg der Homocysteinkonzentration zu verzeichnen.

Bei den zentrifugierten Heparin-Plasma- und Serum-Proben zeigt sich so gut wie keine Veränderung der Homocysteinkonzentration nach 24-stündiger Lagerung bei Raumtemperatur. Zu bedenken ist aber, dass die Homocysteinkonzentration in einer Serum-Probe eventuell bereits bei der ersten Messung im Vergleich zur eigentlichen Plasma-Homocysteinkonzentration etwas erhöht sein kann, da zur Serumgewinnung erst eine vollständige Gerinnung des Blutes vor Zentrifugierung gewährleistet sein muss. In der Zeit bis zur Gerinnung kann die Homocysteinkonzentration also bereits ansteigen. Die zentrifugierten EDTA-Plasma-Proben zeigen einen durchschnittlichen Anstieg der Homocysteinkonzentration um 20%. Dieses ist damit zu erklären, dass in den verwendeten EDTA-Plasma-Röhrchen nach Zentrifugierung kein Gel zwischen Plasma und Erythrozyten vorhanden ist. Somit ist ein Kontakt weiterhin gegeben und der Homocysteinspiegel kann etwas ansteigen. Bei den Heparin-Plasma- und den Serum-Röhrchen ist hingegen eine Gelschicht vorhanden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ein rasches Zentrifugieren der Patientenproben nach Blutentnahme unbedingt notwendig ist. Sind die Proben zentrifugiert, zeigt sich anschließend innerhalb der ersten 24 Stunden bei Raumtemperatur kein signifikanter Anstieg der Homocysteinkonzentration. Dieses gilt, sofern Blutentnahmeröhrchen verwendet werden, die nach der Zentrifugation über eine Gelschicht zwischen Plasma/Serum und den Erythrozyten verfügen.

Die Messungen zum Zeitpunkt 0, also nach Blutentnahme und Zentrifugation, zeigten, dass die Homocysteinkonzentration gleicher Patientenproben in Heparin-Plasma-, EDTA-Plasma- und Serum-Röhrchen nicht signifikant unterschiedlich waren. Alle Proben wurden aber erst nach Gerinnung der Serum-Proben zentrifugiert und gemessen. Die Homocysteinkonzentration könnte also bereits in allen Proben leicht angestiegen sein.

4.2.4 Zeitdauer bis zum Messergebnis

Die Zeitdauer bis zum Eintreffen des Messergebnisses beträgt bei Einsatz des Immulite 2500 Homocystein-Assay 65 Minuten und ist damit deutlich länger als beim ADVIA Centaur, der für die Bearbeitung einer Probe nur 18 Minuten benötigt. Es ist jedoch anzumerken, dass es sich bei Homocystein zwar um einen Risikofaktor, nicht aber um einen Notfallparameter handelt. Die Anforderung der Ermittlung der Homocysteinkonzentration an das Labor geschieht also nicht unter Lebensgefahr für den Patienten bzw. ist für dessen Überlebenschancen in der akuten Gefahrensituation nicht von Bedeutung. Demzufolge unterliegt ein Homocystein-Assay nicht zwingend der Anforderung, ein möglichst schnell abrufbarer und durchführbarer Test zu sein, auch wenn ein schnell durchzuführender Test sicherlich die Arbeitsbedingungen im Labor verbessert und eine Zeitersparnis bedeutet.

5 Zusammenfassung

Eine moderate Hyperhomocysteinämie ($>12 \mu\text{mol/l}$) ist der D.A.CH.-Liga Homocystein zufolge bei 5-10% der Allgemeinbevölkerung und bei bis zu 40% der Patienten mit Gefäßerkrankungen zu erwarten, weshalb die Bestimmung des Homocysteins ein Teil des individuellen Risikoprofils für Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen sein sollte.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Immulite 2500 Homocystein-Assay der Firma DPC (*Diagnostic Products Corporation*) Biermann analytisch evaluiert.

Bei dem Immulite 2500 Homocystein-Assay handelt es sich um einen kompetitiven Festphasen-Chemilumineszenz-Immunoassay. Für die Messung der Intra-Assay-Präzision ($n=20$) wurden Patientenserum vier unterschiedlicher Konzentrationen und Kontrollen drei verschiedener Level gemessen. Die Inter-Assay-Präzision ($n=12$) wurde ebenfalls mit den drei Kontrollen und mit Patientenserum in drei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Desweiteren wurden die Verschleppung und die Verdünnungslinearität gemessen. Zur Ermittlung der Stabilität des Homocysteins in verschiedenen Blutentnahmeröhrchen wurde die Homocysteinkonzentration über 24 Stunden gemessen. Ein Methodenvergleich wurde mit dem ADVIA Centaur (Bayer) und der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) anhand von 118 Patientenproben und zusätzlich anhand von 110 Dialysepatientenproben durchgeführt und nach Bablock/Passing und Bland/Altman ausgewertet.

Die Messung der Intra-Assay-Präzision ergab Variationskoeffizienten in einem Bereich von 3,9% bis 7,4%. Die Variationskoeffizienten der Inter-Assay-Präzision lagen zwischen 5,2% und 10,4%. Die Linearität wurde in einem Bereich von $2,7 \mu\text{mol/l}$ bis $45,5 \mu\text{mol/l}$ getestet, wobei die lineare Regression im ersten Ansatz bei $R = 0,9941$ und im zweiten Ansatz bei $R = 0,996$ lag.

Bei Messungen einer hohen Probe (Mittelwert $46,4 \mu\text{mol/l}$) und einer niedrigen Probe (Mittelwert $6,2 \mu\text{mol/l}$) im Wechsel wurde keine Verschleppung der hohen Probe in die niedrige Probe festgestellt.

Der Methodenvergleich mit dem ADVIA Centaur der Firma Bayer und der HPLC wurde mit Proben in einem Bereich von $2,8 \mu\text{mol/l}$ bis $38,2 \mu\text{mol/l}$ bzw. mit Proben von Dialysepatienten in einem Bereich von $2,9 \mu\text{mol/l}$ bis $49,8 \mu\text{mol/l}$ durchgeführt. Hier ergaben sich gute Korrelationskoeffizienten von $R=0,992$ für den Vergleich des Immulite 2500 mit dem Centaur und $R=0,994$ für den Vergleich des Immulite 2500 mit der HPLC. Auch in der vergleichenden Messung der Dialysepatientenproben korrelieren die ermittelten Ergebnisse gut ($R = 0,971$ (ADVIA Centaur) und $R = 0,993$ (HPLC)). Festgestellt wurde im Methodenvergleich mittels Bland/Altman, dass sowohl der ADVIA Centaur als auch die HPLC identische Patientenproben höher messen als der Immulite 2500. Diese Abweichungen nahmen im Bereich höherer Konzentrationen zu, was einen proportionalen Fehler demonstriert.

Um das Verhalten der Homocysteinkonzentration in unterschiedlichen Blutentnahme-Röhrchen und unter der Voraussetzung zentrifugiert oder nicht zentrifugiert zu untersuchen, wurde eine Stabilitätsmessung über 24 Stunden bei Aufbewahrung der Proben bei Raumtemperatur

vorgenommen. Verwendet wurden EDTA-Plasma-, Heparin-Plasma- und Serum-Röhrchen. Die Ergebnisse zeigten einen starken Anstieg der Homocysteinkonzentration in allen nicht zentrifugierten Proben. In den zentrifugierten Proben verhielt sich die Homocysteinkonzentration annähernd konstant.

Der Immulite 2500 Homocystein-Assay ist einfach in der Handhabung und liefert nach 65 Minuten das Ergebnis. Empfohlen ist eine Verwendung von Heparin- oder EDTA-Plasma. Auch Serum kann verwendet werden, sollte aber umgehend zentrifugiert werden. Der Immulite 2500 Homocystein-Assay ist geeignet für den Einsatz im Routinelabor.

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Arzneistoffe, die eine Hyperhomocysteinämie verursachen können
Tabelle 2:	Charakteristika derzeit verfügbarer Methoden zur Homocysteinbestimmung
Tabelle 3:	Immolute 2500 Homocystein Kontrollen ($\mu\text{mol/l}$)
Tabelle 4:	Schema der Verdünnungsreihen
Tabelle 5:	Intra-Assay-Präzision
Tabelle 6:	Inter-Assay-Präzision
Tabelle 7:	Ergebnisse der Verdünnungsreihen
Tabelle 8:	Ergebnisse der Verschleppung
Tabelle 9:	Stabilitätsmessung der nicht zentrifugierten Heparin-Plasma-Proben
Tabelle 10:	Stabilitätsmessung der zentrifugierten Heparin-Plasma-Proben
Tabelle 11:	Stabilitätsmessung der nicht zentrifugierten Serum-Proben
Tabelle 12:	Stabilitätsmessung der zentrifugierten Serum-Proben
Tabelle 13:	Stabilitätsmessung der nicht zentrifugierten EDTA-Plasma-Proben
Tabelle 14:	Stabilitätsmessung der zentrifugierten EDTA-Plasma-Proben
Tabelle 15:	Vergleich der Messwerte in verschiedenen Blutentnahmeröhrchen

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Homocystein
Abbildung 2:	Homocysteinstoffwechsel (aus Konsensuspapier der D.A.CH.-Liga Homocystein)
Abbildung 3:	Immolute 2500
Abbildung 4:	ADVIA Centaur
Abbildung 5:	Chromatogramm
Abbildung 6:	1. Verdünnungsreihe
Abbildung 7:	2. Verdünnungsreihe
Abbildung 8:	Graphische Darstellung der Stabilität nicht zentrifugierter Heparin-Plasma-Proben
Abbildung 9:	Graphische Darstellung der Stabilität zentrifugierter Heparin-Plasma-Proben
Abbildung 10:	Graphische Darstellung der Stabilität nicht zentrifugierter Serum-Proben
Abbildung 11:	Graphische Darstellung der Stabilität zentrifugierter Serum-Proben
Abbildung 12:	Graphische Darstellung der Stabilität nicht zentrifugierter EDTA-Plasma-Proben
Abbildung 13:	Graphische Darstellung der Stabilität zentrifugierter EDTA-Plasma-Proben
Abbildung 14:	Vergleich der Messwerte in verschiedenen Blutentnahmeröhrchen zum Zeitpunkt Null
Abbildung 15:	Methodenvergleich Immolute 2500 und ADVIA Centaur nach Bablok/Passing
Abbildung 16:	Methodenvergleich Immolute 2500 und ADVIA Centaur nach Bland/Altman
Abbildung 17:	Methodenvergleich Immolute 2500 und HPLC nach Bablok/Passing
Abbildung 18:	Methodenvergleich Immolute 2500 und HPLC nach Bland/Altman
Abbildung 19:	Methodenvergleich ADVIA Centaur und HPLC nach Bablok/Passing
Abbildung 20:	Methodenvergleich ADVIA Centaur und HPLC nach Bland/Altman
Abbildung 21:	Methodenvergleich Immolute 2500 und ADVIA Centaur anhand von Dialysepatienten-Proben nach Bablok/Passing
Abbildung 22:	Methodenvergleich Immolute 2500 und ADVIA Centaur anhand von Dialysepatientenproben nach Bland/Altman
Abbildung 23:	Methodenvergleich Immolute 2500 und HPLC anhand von Dialysepatientenproben nach Bablok/Passing
Abbildung 24:	Methodenvergleich Immolute 2500 und HPLC anhand von Dialysepatientenproben nach Bland/Altman
Abbildung 25:	Methodenvergleich ADVIA Centaur und HPLC anhand von Dialysepatientenproben nach Bablok/Passing
Abbildung 26:	Methodenvergleich ADVIA Centaur und HPLC anhand von Dialysepatientenproben nach Bland/Altman

8 Abkürzungsverzeichnis

bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d. h.	das heißt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al	lat.: et alii (und andere)
evtl.	eventuell
g	Gramm
h	Stunde
HPLC	Hochdruck Flüssigkeitschromatographie
HCY	Homocystein
IA	Immuno-Assay
k. A.	keine Angabe
KHK	koronare Herzkrankheit
l	Liter
LOA	<i>limits of agreement</i>
LDI	<i>logic Driven Incubation</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
MVG	Methodenvergleich
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
Methyl-THF	Methyl-Tetrahydrofolat
µg	mikrogramm
µl	mikroliter
µmol	mikromol
mg	milligramm
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
pAVK	periphere arterielle Verschußkrankheit
R ²	Korrelationskoeffizient
RNS	Ribonukleinsäure
SAH	S-Adenosyl-L-Homocystein
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
THF	Tetrahydrofolat
UV	ultra violett
u. a.	und andere
VK	Variationskoeffizient
z. B.	zum Beispiel

9 Literaturverzeichnis

- Agnati, L.F., et al., *Studies on homocysteine plasma levels in Alzheimer's patients. Relevance for neurodegeneration.* J Neural Transm, 2005. 112(1): p. 163-9.
- Allen, R.H., S.P. Stabler, and J. Lindenbaum, *Relevance of vitamins, homocysteine and other metabolites in neuropsychiatric disorders.* Eur J Pediatr, 1998. 157 Suppl 2: p. S122-6.
- Altman, D.G., Bland, J.M. *Measurement in Medicine: the Analysis of Method Comparison Studies.* The Statistician 1983. 32: p. 307-317.
- Becker, A., et al., *Hyperhomocysteinemia is associated with coronary events in type 2 diabetes.* J Intern Med, 2003. 253(3): p. 293-300.
- Beitz, R., et al., *Vitamins--dietary intake and intake from dietary supplements in Germany.* Eur J Clin Nutr, 2002. 56(6): p. 539-45.
- Bienvenu, T., et al., *Elevated total plasma homocysteine, a risk factor for thrombosis. Relation to coagulation and fibrinolytic parameters.* Thromb Res, 1993. 70(2): p. 123-9.
- Blom, H.J., et al., *Lipid peroxidation in homocysteinemia.* J Inher Metab Dis, 1992. 15(3): p. 419-22.
- Bostom, A.G. and B.F. Culleton, *Hyperhomocysteinemia in chronic renal disease.* J Am Soc Nephrol, 1999. 10(4): p. 891-900.
- Bostom, A.G., et al., *Hyperhomocysteinemia and traditional cardiovascular disease risk factors in end-stage renal disease patients on dialysis: a case-control study.* Atherosclerosis, 1995. 114(1): p. 93-103.
- Bostom, A.G., et al., *Hyperhomocysteinemia, hyperfibrinogenemia, and lipoprotein (a) excess in maintenance dialysis patients: a matched case-control study.* Atherosclerosis, 1996. 125(1): p. 91-101.
- Boushey, C.J., et al., *A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes.* Jama, 1995. 274(13): p. 1049-57.
- Brattstrom, L., et al., *Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis.* Circulation, 1998. 98(23): p. 2520-6.
- Broekman, M.J., A.M. Eijro, and A.J. Marcus, *Inhibition of human platelet reactivity by endothelium-derived relaxing factor from human umbilical vein endothelial cells in suspension: blockade of aggregation and secretion by an aspirin-insensitive mechanism.* Blood, 1991. 78(4): p. 1033-40.
- Burke, A.P., et al., *Increased serum homocysteine and sudden death resulting from coronary atherosclerosis with fibrous plaques.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. 22(11): p. 1936-41.
- Clarke, R. and R. Collins, *Can dietary supplements with folic acid or vitamin B6 reduce cardiovascular risk? Design of clinical trials to test the homocysteine hypothesis of vascular disease.* J Cardiovasc Risk, 1998. 5(4): p. 249-55.
- Clarke, R., et al., *Variability and determinants of total homocysteine concentrations in plasma in an elderly population.* Clin Chem, 1998. 44(1): p. 102-7.
- Cravo, M.L., et al., *Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status.* Am J Clin Nutr, 1996. 63(2): p. 220-4.
- Davis, S.R., et al., *Dietary vitamin B-6 restriction does not alter rates of homocysteine remethylation or synthesis in healthy young women and men.* Am J Clin Nutr, 2005. 81(3): p. 648-55.
- Diekman, M.J., et al., *Determinants of changes in plasma homocysteine in hyperthyroidism and hypothyroidism.* Clin Endocrinol (Oxf), 2001. 54(2): p. 197-204.
- Dierkes, J., et al., *Factors explaining the difference of total homocysteine between men and women in the European Investigation Into Cancer and Nutrition Potsdam study.* Metabolism, 2001. 50(6): p. 640-5.
- Dubey, R.K., *Vasodilator-derived nitric oxide inhibits fetal calf serum- and angiotensin-II-induced growth of renal arteriolar smooth muscle cells.* J Pharmacol Exp Ther, 1994. 269(1): p. 402-8.
- Ducros, V., et al., *Methods for homocysteine analysis and biological relevance of the results.* J of chromatography B, 2002. 781: p. 207-226.
- Dudman, N.P., D.E. Wilcken, and R. Stocker, *Circulating lipid hydroperoxide levels in human hyperhomocysteinemia. Relevance to development of arteriosclerosis.* Arterioscler Thromb, 1993. 13(4): p. 512-6.

- Dudman, N.P., et al., *Human arterial endothelial cell detachment in vitro: its promotion by homocysteine and cysteine*. *Atherosclerosis*, 1991. 91(1-2): p. 77-83.
- Emerson, M., et al., *Endogenous nitric oxide acts as a natural antithrombotic agent in vivo by inhibiting platelet aggregation in the pulmonary vasculature*. *Thromb Haemost*, 1999. 81(6): p. 961-6.
- Foody, J.M., et al., *Homocysteine and lipoprotein(a) interact to increase CAD risk in young men and women*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. 20(2): p. 493-9.
- Fryer, R.H., et al., *Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells*. *Arterioscler Thromb*, 1993. 13(9): p. 1327-33.
- Gerritsen, T., J.G. Vaughn, and H.A. Waisman, *The identification of homocystine in the urine*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1962. 9: p. 493-6.
- Graham, I.M., et al., *Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project*. *Jama*, 1997. 277(22): p. 1775-81.
- Gravina-Taddei, C.F., et al., *Hyperhomocysteinemia as a risk factor for coronary atherosclerotic diseases in the elderly*. *Arq Bras Cardiol*, 2005. 85(3): p. 166-73.
- Guttormsen, A.B., et al., *Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia (> or = 40 micromol/liter). The Hordaland Homocysteine Study*. *J Clin Invest*, 1996. 98(9): p. 2174-83.
- Guttormsen, A.B., et al., *Disposition of homocysteine in subjects heterozygous for homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency: relationship between genotype and phenotype*. *Am J Med Genet*, 2001. 100(3): p. 204-13.
- Guttormsen, A.B., et al., *Kinetic basis of hyperhomocysteinemia in patients with chronic renal failure*. *Kidney Int*, 1997. 52(2): p. 495-502.
- Guttormsen, A.B., et al., *Kinetics of plasma homocysteine in healthy subjects after peroral homocysteine loading*. *Clin Chem*, 1993. 39(7): p. 1390-7.
- Halvorsen, B., et al., *Effect of homocysteine on copper ion-catalyzed, azo compound-initiated, and mononuclear cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein*. *J Lipid Res*, 1996. 37(7): p. 1591-600.
- Harker, L.A., et al., *Homocystine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis*. *J Clin Invest*, 1976. 58(3): p. 731-41.
- Harmon, D.L., et al., *The common 'thermolabile' variant of methylene tetrahydrofolate reductase is a major determinant of mild hyperhomocysteinemia*. *Qjm*, 1996. 89(8): p. 571-7.
- Heinecke, J.W., et al., *Oxidation of low density lipoprotein by thiols: superoxide-dependent and -independent mechanisms*. *J Lipid Res*, 1993. 34(12): p. 2051-61.
- Herrmann, M., et al., *Comparison of the influence of volume-oriented training and high-intensity interval training on serum homocysteine and its cofactors in young, healthy swimmers*. *Clin Chem Lab Med*, 2003. 41(11): p. 1525-31.
- Herrmann, M., et al., *Homocysteine increases during endurance exercise*. *Clin Chem Lab Med*, 2003. 41(11): p. 1518-24.
- Herrmann, M., et al., *Increased osteoclast activity in the presence of increased homocysteine concentrations*. *Clin Chem*, 2005. 51(12): p. 2348-53.
- Herrmann, M., et al., *Relation between homocysteine and biochemical bone turnover markers and bone mineral density in peri- and post-menopausal women*. *Clin Chem Lab Med*, 2005. 43(10): p. 1118-23.
- Herrmann, M., T. Widmann, and W. Herrmann, *Homocysteine--a newly recognised risk factor for osteoporosis*. *Clin Chem Lab Med*, 2005. 43(10): p. 1111-7.
- Hirano, K., et al., *Homocysteine induces iron-catalyzed lipid peroxidation of low-density lipoprotein that is prevented by alpha-tocopherol*. *Free Radic Res*, 1994. 21(5): p. 267-76.
- Ho, P.I., et al., *Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine*. *Neurobiol Dis*, 2003. 14(1): p. 32-42.
- Hogg, N., et al., *Inhibition of macrophage-dependent low density lipoprotein oxidation by nitric-oxide donors*. *J Lipid Res*, 1995. 36(8): p. 1756-62.
- Homocystein Lowering Trialists' Collaboration: *Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials*. *Bmj*, 1998. 316(7135): p. 894-8.
- Hoogeveen, E.K., et al., *Hyperhomocysteinemia increases risk of death, especially in type 2 diabetes: 5-year follow-up of the Hoorn Study*. *Circulation*, 2000. 101(13): p. 1506-11.
- Hyland, K., et al., *Demyelination and decreased S-adenosylmethionine in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency*. *Neurology*, 1988. 38(3): p. 459-62.

- Jacques, P.F., et al., *Serum total homocysteine concentrations in adolescent and adult Americans: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey*. Am J Clin Nutr, 1999. 69(3): p. 482-9.
- Jacques, P.F., et al., *The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations*. N Engl J Med, 1999. 340(19): p. 1449-54.
- Jones, B.G., F.A. Rose, and N. Tudball, *Lipid peroxidation and homocysteine induced toxicity*. Atherosclerosis, 1994. 105(2): p. 165-70.
- Kang, S.S., et al., *Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease*. Am J Hum Genet, 1991. 48(3): p. 536-45.
- Kang, S.S., P.W. Wong, and M. Norusis, *Homocysteinemia due to folate deficiency*. Metabolism, 1987. 36(5): p. 458-62.
- Klee, G.G., *Cobalamin and folate evaluation: measurement of methylmalonic acid and homocysteine vs vitamin B(12) and folate*. Clin Chem, 2000. 46(8 Pt 2): p. 1277-83.
- Klerk, M., et al., *MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis*. Jama, 2002. 288(16): p. 2023-31.
- Lentz, S.R. and J.E. Sadler, *Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine*. J Clin Invest, 1991. 88(6): p. 1906-14.
- Lentz, S.R., et al., *Effect of hyperhomocysteinemia on protein C activation and activity*. Blood, 2002. 100(6): p. 2108-12.
- Lindenbaum, J., et al., *Prevalence of cobalamin deficiency in the Framingham elderly population*. Am J Clin Nutr, 1994. 60(1): p. 2-11.
- Lipton, S.A., et al., *Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(11): p. 5923-8.
- Lowering blood homocysteine with folic acid based supplements: meta-analysis of randomised trials*. Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Bmj, 1998. 316(7135): p. 894-8.
- Lubec, B., et al., *Homocysteine increases cyclin-dependent kinase in aortic rat tissue*. Circulation, 1996. 94(10): p. 2620-5.
- Majors, A., L.A. Ehrhart, and E.H. Pezacka, *Homocysteine as a risk factor for vascular disease. Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. 17(10): p. 2074-81.
- Majors, A.K., et al., *Upregulation of smooth muscle cell collagen production by homocysteine-insight into the pathogenesis of homocystinuria*. Mol Genet Metab, 2002. 76(2): p. 92-9.
- Mansoor, M.A., et al., *Dynamic relation between reduced, oxidized, and protein-bound homocysteine and other thiol components in plasma during methionine loading in healthy men*. Clin Chem, 1992. 38(7): p. 1316-21.
- Mansoor, M.A., et al., *Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other amino thiols in patients with homocystinuria*. Metabolism, 1993. 42(11): p. 1481-5.
- Matthews, J.H., *Cobalamin and folate deficiency in the elderly*. Baillieres Clin Haematol, 1995. 8(3): p. 679-97.
- McCully, K.S., *Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis*. Am J Pathol, 1969. 56(1): p. 111-28.
- McKusick; *Heritable disorders of connective tissue*; 3 ed. Louis: C. V. Mosby 1966
- McLean, R.R., et al., *Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons*. N Engl J Med, 2004. 350(20): p. 2042-9.
- Mills, J.L. and C. Signore, *Neural tube defect rates before and after food fortification with folic acid*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2004. 70(11): p. 844-5.
- Mills, J.L., et al., *Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects*. Lancet, 1995. 345(8943): p. 149-51.
- Morris, M.S., et al., *Total homocysteine and estrogen status indicators in the Third National Health and Nutrition Examination Survey*. Am J Epidemiol, 2000. 152(2): p. 140-8.
- Moustapha, A., et al., *Prospective study of hyperhomocysteinemia as an adverse cardiovascular risk factor in end-stage renal disease*. Circulation, 1998. 97(2): p. 138-41.
- Mudd, S.H., et al., *Homocystinuria: An Enzymatic Defect*. Science, 1964. 143: p. 1443-5.
- Mudd, S.H., et al., *Disorders of transsulfuration*. In: Scriver, C.R., et al., *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1995: 1279-327.
- Nedrebo, B.G., et al., *Plasma total homocysteine levels in hyperthyroid and hypothyroid patients*. Metabolism, 1998. 47(1): p. 89-93.
- Nygard, O., et al., *Major lifestyle determinants of plasma total homocysteine distribution: the Hordaland Homocysteine Study*. Am J Clin Nutr, 1998. 67(2): p. 263-70.

- Nygard, O., et al., *Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease*. N Engl J Med, 1997. 337(4): p. 230-6.
- Nygard, O., et al., *Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study*. Jama, 1995. 274(19): p. 1526-33.
- O'Callaghan, P., et al., *Smoking and plasma homocysteine*. Eur Heart J, 2002. 23(20): p. 1580-6.
- Palareti, G., et al., *Blood coagulation changes in homocystinuria: effects of pyridoxine and other specific therapy*. J Pediatr, 1986. 109(6): p. 1001-6.
- Parthasarathy, S., *Oxidation of low-density lipoprotein by thiol compounds leads to its recognition by the acetyl LDL receptor*. Biochim Biophys Acta, 1987. 917(2): p. 337-40.
- Pfund A, Wendland G, Geisen C; *Verlässlichkeit der Homocystein-Messung*; Herz/Kreis (10/99), 31.
- Passing H, Bablok. *A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part I*. J Clin Chem Clin Biochem 1983. 21(11): p. 709-20.
- Quadri, P., et al., *Homocysteine and B vitamins in mild cognitive impairment and dementia*. Clin Chem Lab Med, 2005. 43(10): p. 1096-100.
- Radomski, M.W., et al., *Platelet adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive and cytokine induced nitric oxide*. Cardiovasc Res, 1993. 27(7): p. 1380-2.
- Refsum, H., et al., *Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion*. Clin Chem, 2004. 50(1): p. 3-32.
- Refsum, H., F. Wesenberg, and P.M. Ueland, *Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate*. Cancer Res, 1991. 51(3): p. 828-35.
- Refsum, H., S. Helland, and P.M. Ueland, *Fasting plasma homocysteine as a sensitive parameter of antifolate effect: a study of psoriasis patients receiving low-dose methotrexate treatment*. Clin Pharmacol Ther, 1989. 46(5): p. 510-20.
- Refsum, H., S. Helland, and P.M. Ueland, *Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine*. Clin Chem, 1985. 31(4): p. 624-8.
- Rodgers, G.M. and M.T. Conn, *Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells*. Blood, 1990. 75(4): p. 895-901.
- Rodgers, G.M., W.H. Kane, and R.E. Pitas, *Formation of factor Va by atherosclerotic rabbit aorta mediates factor Xa-catalyzed prothrombin activation*. J Clin Invest, 1988. 81(6): p. 1911-9.
- Rosenquist, T.H., S.A. Ratashak, and J. Selhub, *Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(26): p. 15227-32.
- Scott, J.M., et al., *Effects of the disruption of transmethylation in the central nervous system: an animal model*. Acta Neurol Scand Suppl, 1994. 154: p. 27-31.
- Scott, J.M., et al., *Pathogenesis of subacute combined degeneration: a result of methyl group deficiency*. Lancet, 1981. 2(8242): p. 334-7.
- Selhub, J., et al., *Serum total homocysteine concentrations in the third National Health and Nutrition Examination Survey (1991-1994): population reference ranges and contribution of vitamin status to high serum concentrations*. Ann Intern Med, 1999. 131(5): p. 331-9.
- Selhub, J., et al., *Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population*. Jama, 1993. 270(22): p. 2693-8.
- Seshadri, S., et al., *Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease*. N Engl J Med, 2002. 346(7): p. 476-83.
- Stampfer, M.J., et al., *A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians*. Jama, 1992. 268(7): p. 877-81.
- Stanger, O., et al., *DACH-LIGA homocystein (german, austrian and swiss homocysteine society): consensus paper on the rational clinical use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases: guidelines and recommendations*. Clin Chem Lab Med, 2003. 41(11): p. 1392-403.
- Starkebaum, G. and J.M. Harlan, *Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine*. J Clin Invest, 1986. 77(4): p. 1370-6.
- Stehouwer, C.D., et al., *Plasma homocysteine concentration predicts mortality in non-insulin-dependent diabetic patients with and without albuminuria*. Kidney Int, 1999. 55(1): p. 308-14.

- Steinberg, D., et al., *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity.* N Engl J Med, 1989. 320(14): p. 915-24.
- Stipanuk, M.H., *Metabolism of sulfur-containing amino acids.* Annu Rev Nutr, 1986. 6: p. 179-209.
- Surtees, R., *Biochemical pathogenesis of subacute combined degeneration of the spinal cord and brain.* J Inherit Metab Dis, 1993. 16(4): p. 762-70.
- Surtees, R., *Demyelination and inborn errors of the single carbon transfer pathway.* Eur J Pediatr, 1998. 157 Suppl 2: p. S118-21.
- Surtees, R., J. Leonard, and S. Austin, *Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid S-adenosylmethionine in inborn errors of methyl-transfer pathway.* Lancet, 1991. 338(8782-8783): p. 1550-4.
- Takahashi, M., et al., *Nitric oxide attenuates adhesion molecule expression in human endothelial cells.* Cytokine, 1996. 8(11): p. 817-21.
- Takenaka, T., Y. Itaya, and H. Suzuki, *Young hemodialysis patients are exposed to hyperhomocysteinemia.* J Ren Nutr, 2005. 15(4): p. 435-40.
- Taylor, L.M., Jr., et al., *Prospective blinded study of the relationship between plasma homocysteine and progression of symptomatic peripheral arterial disease.* J Vasc Surg, 1999. 29(1): p. 8-19; discussion 19-21.
- Tsai, A.W., et al., *Serum homocysteine, thermolabile variant of methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR), and venous thromboembolism: Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE).* Am J Hematol, 2003. 72(3): p. 192-200.
- Tsai, J.C., et al., *Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(14): p. 6369-73.
- Tsai, M.Y., et al., *Molecular and biochemical approaches in the identification of heterozygotes for homocystinuria.* Atherosclerosis, 1996. 122(1): p. 69-77.
- Ubbink, J.B., et al., *The effect of a subnormal vitamin B-6 status on homocysteine metabolism.* J Clin Invest, 1996. 98(1): p. 177-84.
- Ueland, P.M., et al., *Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications.* Clin Chem, 1993. 39(9): p. 1764-79.
- Undas, A., et al., *Homocysteine inhibits inactivation of factor Va by activated protein C.* J Biol Chem, 2001. 276(6): p. 4389-97.
- van Meurs, J.B., et al., *Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture.* N Engl J Med, 2004. 350(20): p. 2033-41.
- Vollset, S.E., et al., *Plasma total homocysteine and cardiovascular and noncardiovascular mortality: the Hordaland Homocysteine Study.* Am J Clin Nutr, 2001. 74(1): p. 130-6.
- Vollset, S.E., et al., *Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine study.* Am J Clin Nutr, 2000. 71(4): p. 962-8.
- von Eckardstein, A., et al., *Effects of age, lipoproteins, and hemostatic parameters on the role of homocyst(e)inemia as a cardiovascular risk factor in men.* Arterioscler Thromb, 1994. 14(3): p. 460-4.
- Wald, D.S., M. Law, and J.K. Morris, *Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis.* Bmj, 2002. 325(7374): p. 1202.
- Wall, R.T., et al., *Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury.* Thromb Res, 1980. 18(1-2): p. 113-21.
- Wilcken, D.E. and B. Wilcken, *The natural history of vascular disease in homocystinuria and the effects of treatment.* J Inherit Metab Dis, 1997. 20(2): p. 295-300.
- Willems, F.F., et al., *Coronary endothelial function in hyperhomocysteinemia: improvement after treatment with folic acid and cobalamin in patients with coronary artery disease.* J Am Coll Cardiol, 2002. 40(4): p. 766-72.
- Wilson, A., et al., *A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida.* Mol Genet Metab, 1999. 67(4): p. 317-23.
- Witztum, J.L. and D. Steinberg, *Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis.* J Clin Invest, 1991. 88(6): p. 1785-92.
- Zhou, J., et al., *Dietary supplementation with methionine and homocysteine promotes early atherosclerosis but not plaque rupture in ApoE-deficient mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. 21(9): p. 1470-6.

10 Anhang

6.4.1 Intra-Assay

Messung	niegrig	mittel	mittel	hoch	Kontrolle Level 1	Kontrolle Level 2
	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)		
1	3,45	16,5	30,4	38,3	7,72	19,2
2	3,47	14,2	30	45	8,83	18,9
3	3,43	16,1	30	45,5	8,96	18,5
4	3,89	16,5	28	42,6	9,12	18,4
5	3,73	17,2	29,7	43,7	9,26	18,8
6	3,76	16,9	29,7	40,3	8,28	17,8
7	3,8	15,3	29,8	46,8	8,5	20,1
8	3,76	15,9	27,6	43,5	8,8	19,7
9	3,9	17,6	29,3	43,5	7,45	19,8
10	3,31	15,9	28,2	42,5	8,58	17,2
11	3,97	16,9	29,2	41,2	8,49	17,7
12	3,78	18,2	28,1	42,3	8,88	19,4
13	4,16	17,6	29,2	42,4	8,1	19,8
14	3,7	16,9	27	44,3	8,43	18,6
15	3,79	17,9	27,2	46,1	8,09	19,2
16	4,38	17,5	29,7	41,1	8,42	17,5
17	4,18	17,4	29,5	40,8	8,32	19,7
18	4,15	16,4	30,8	44,6	8,7	18,3
19	3,98	16,7	27,2	42,9	8,16	19,6
20	4,12	18,9	29,4	39,7	8,1	17,7
Mittelwert:	3,84	16,8	29	42,9	8,46	18,8
SD:	0,28	1,03	7,14	2,15	0,44	0,86
VK (%):	7,36	6,34	3,93	5,12	5,39	4,76

6.4.2 Inter-Assay

Datum:	niedrig	mittel	hoch	Kontrollr Level 1:	Kontrolle Level 2:
	($\mu\text{mol/L}$)	($\mu\text{mol/L}$)	($\mu\text{mol/L}$)		
22.09.2004		27,8	45,1	7,78	16,8
23.09.2004	3,62	32,6	43,9	8,63	19,2
24.09.2004	4,16	31,4	47,4	10,4	21,7
25.09.2004	4,32	26,8	44,8	7,83	18
26.09.2004	4,3	27,4	49,3	7,91	16,9
27.09.2004	3,91	27,3	42,6	9,04	18,9
28.09.2004	3,99	24,6	40,6	7,67	16,8
29.09.2004	3,55	26,9	45,9	8,55	16,9
30.09.2004	4,44	27,7	44,4	8,42	17,2
01.10.2004	4,32	28,4	41,7	10,1	17,9
02.10.2004	3,52	27,9	43,6	9,24	19,8
03.10.2004	4	23,2	42,9	9,92	18
Mittelwert:	4	27,66	44,35	8,8	18,18
SD:	0,32	2,41	2,3	0,92	1,44
VK (%):	8	8,72	5,21	10,41	7,9

6.4.3 Verdünnungslinearität

Messung:	1. Verdünnungsreihe:	2. Verdünnungsreihe:	Berechnete Verdünnung:
	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)
1	45,5	45,5	45,5
2	33,8	32,4	30,33
3	22,5	22,8	20,22
4	15,7	14,8	13,48
5	10,7	10,4	8,99
6	6,92	6,19	5,99
7	4,94	4,5	3,99
8	2,85	2,84	2,66
9	<2	<2	1,78

6.4.4 Verschleppung

Messung:	Hohe Probe:	Niedrige Probe:
	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)
1	47	7,63
2	46,4	6,96
3	43,6	6,34
4	48,5	4,53
5	47,5	5,06
6	45,8	5,6
7	47,6	6,71
8	44,4	6,35
Mittelwert	46,35	6,15
SD	1,57	0,96
VK (%)	3,39	15,6

6.4.5 Stabilität

	Messung (h):										
Heparin											
nicht zentr.:	0	0,5	1	2	4	6	12	24	Mittelwert:	SD:	VK (%):
1	6,4	5,8	5,5	5,7		7,6	11,1	14,9	8,14	3,56	43,74
2	4,1	4,8		4,6		6,4	9,3	15,3	7,42	4,3	57,95
3	7	7,4	6,8	6,4		8,5	11,6	16,2	9,13	3,31	36,25
4	5,8	6,5	6,3	5,9		7,7	10,3	15,9	8,34	3,68	44,13
5	5,9	6,1	5,5	6,6		7,7	10,6	17,8	8,6	4,41	51,28
6	16,2	16,4	16,2	16,9		18,8	22,4	30,2	19,59	5,19	26,49
7	6,8	6,7	6,6	7,6		10,2	13,1	12,7	9,1	2,88	31,65
8	7,3	7,3	8	8,9	8,1	8,3	9,6	12,9	8,8	1,83	20,8
9	4,2	4,7	4,2	6,1	4,9	6,3	9,7	15,2	6,91	3,8	54,99
10	4,8	5	5,1	6,5	6,3	6,5	9,8	13,2	7,15	2,92	40,84
11	3,7	3,1	5,1	3,7	4,7	4,9	6,4	12,9	5,56	3,14	56,47
12	5,9	5,7	5,1	6,1	6,5	6,7	10,6	15,3	7,74	3,49	45,09
Heparin zentr.:											
1	5,5	5,2	4,9	4,3		5,2	5,6	6,2	5,27	0,55	10,44
2	4,3	3,5	4	3,7		3,5	3,8	4,3	3,87	0,31	8,01
3	7,3	6,6	6,1	6		5,9	6,3	6,7	6,41	0,45	7,02
4	6,6	5,5	5	5,2		5,8	6,1	6	5,74	0,51	8,89
5	6,3	5,3	5,9	5,1		6	5,9	6,6	5,87	0,49	8,35
6	17	16,2	15,1	15,6		16,7	17,1	19	16,67	1,17	7,02
7	7,1	6,3	6,5	6,4		6,4	6,5	7,5	6,67	0,42	6,3
8	7,5	7	6,7	7	6,5	5,7	6	7,4	6,73	0,60	8,92
9	4,4	4,3	3,7	4,2	3,7	3,2	3,7	4,2	3,93	0,39	9,92
10	4,7	4,3	4,4	4,1	3,6	4,1	4	4,2	4,18	0,30	7,18
11		3,6	3,5	3	2,8	3	3,7	3,3	3,27	0,32	9,79

12	5,7	5,8	5,6	4,7	4,6	4,9	5,2	5,7	5,28	0,46	8,71
<u>Serum zentr.:</u>											
1	5,6	5,6	5,2	4,8		5,1	5,7	5,7	5,39	0,33	6,12
2	3,9	3,5	3,6	3		4	4	4	3,71	0,38	10,24
3	6,9	6,2	6,2	5,2		6,4	6	6,7	6,23	0,51	8,19
4	5,9	5,7	5,6	4,8		4,9	5,9	6,5	5,61	0,55	9,8
5	6,2	5,3	5,2	5,2		6,3	6,1	6,7	5,86	0,57	9,73
6	16,2	16	16	15,7		16	15,6	17,3	16,11	0,52	3,23
7	6,7	6,1	6,3	6,4		6,6	6,9	7,5	6,64	0,43	6,48
8	7,5	7,1	7,3	7	6,2	5,5	5,9	7,2	6,71	0,69	10,28
9	4,4	4,2	4	4,6	3,4	3,2	3,5	3,9	3,90	0,47	12,05
10	4,5	4,3	4,3	4,8	3,8	3,3	3,9	4	4,11	0,43	10,46
11	3,5	3,4	3,3	3	3	3	2,9	3,6	3,21	0,25	7,79
12	5,5	5,5	5,2	5,1	5,2	5	6,2	5,4	5,39	0,35	6,49
<u>Serum nicht zentr.:</u>											
1	4,3	4,3	4,5	3,7		6,8	10,6	18,5	7,53	5,00	66,4
2	5,9	5,5	5	4,8		6,7	9,8		6,28	1,69	26,91
3	6,4	6,3	6,8	6,5		9,7	15,4	21,8	10,41	5,56	53,41
4	6,4	6,1	6,2	5,6		8,7	10,3	17,5	8,69	3,93	45,22
5	5,6	5,9	6,5	6,1		8,8	8,7	11,9	7,64	2,12	27,75
6	16,8	17,2		17,4		19	19,8	26,8	19,50	3,43	17,59
7	6,7	6,4	7	7,1		11,1	11,8	15,3	9,34	3,18	34,05
8	7,3	7,2	7,5	8,7	7,2	7,8	11,1	17,5	9,29	3,34	35,95
9	4,8	4,9	4,6	6,4	5,9	4,8	7,3	13,5	6,53	2,78	42,57
10	4,3	5,1	4,8	6,3	5,2	4,9	7,5	14,2	6,54	3,05	46,64
11	3,3	3,6	3,8	4	3,6	4,6	6,8	13,8	5,44	3,33	61,21
12	5,8	5,8	5,5	6	6,5	6,2	10,1	16,6	7,81	3,60	46,09
<u>EDTA nicht zentr.:</u>											
1	5,3	4,8	5,6	5,2		7,3	9,7	11,1	7,00	2,30	32,86
2	4,1	4,2	4,4	3,2		5,1	7,8	10,5	5,61	2,41	42,96
3	5,7	6,2	5,8	5,8		7,7	10,4	13,1	7,81	2,67	34,19
4	6	5,6	5,5	5,2		7,1	9,6	11,9	7,27	2,35	32,32
5	5,1	4,9	5,8	5,5		6,8	9,1	10,5	6,81	2,01	29,52
6	15,5	14,8	14,1	15,8		15,4	19,5	25,3	17,20	3,67	21,34
7	6	6,3	6,5	6,2		8,3	11,1	14,7	8,44	3,06	36,26
8	6,1	7,2	6,5	8,6	8,1	7,4	11	15	8,74	2,76	31,58
9	4,2	4,1	4,3	6,1	5	6,1	9,2	13,7	6,59	3,11	47,19
10	4,5	4,4	4,2	5,8	4,1	5,6	9,3	13,6	6,44	3,14	48,76
11	3,1	3,3	3,4	3,4	4,3	4,9	7,6	11,6	5,20	2,79	53,65
12	5,2	6	4,9	5,6	5,7	7,3	10,9	14,4	7,50	3,17	42,27
<u>EDTA zentr.:</u>											
1	6,7	7,1	6,7	7	5,9	6,5	6,7	8,2	6,85	0,61	8,91
2	4,5	4	4,2	4,2	3,3	3,9	4,9	5,3	4,29	0,58	13,52
3	4,6	4	4,1	4,7	3	3,6	4,1	5	4,14	0,60	14,49
4	3,6	2,8	2,7	2,7	3	2,8	3,5	4,3	3,18	0,54	16,98
5	5,7	5,3	5,6	5,4	4,9	5,6	6,4	7,4	5,79	0,73	12,61

6.4.6 Methodenvergleich

				Durchschnitt	Differenz	Differenz	Durchschnitt
Barcode:	Immolute 2500:	Centaur:	HPLC:	(Centaur+Immu)/2:	Centaur-Immu:	HPLC-Immu:	(HPLC+Immu)/2:
	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)
0-214	2,84	5,4	3,6	4,12	2,56	0,76	3,22
1018	3,2	6,6	5	4,9	3,4	1,8	4,1
0-223	4,7	8,7	6,4	6,7	4	1,7	5,55
0-224	4,7	7,9	6,3	6,3	3,2	1,6	5,5
0-207	5,5	8,9	7,7	7,2	3,4	2,2	6,6
0-217	5,8	7,3	6,7	6,55	1,5	0,9	6,25
0-213	6	10,1	8	8,05	4,1	2	7
0-221	7,1	9,2	8,2	8,15	2,1	1,1	7,65
0-205	8,3	14,9	11,8	11,6	6,6	3,5	10,05
0-222	10,6	13,3	14	11,95	2,7	3,4	12,3
0-212	12,9	18,4	14,6	15,65	5,5	1,7	13,75
1001	13,2	19,8	14,9	16,5	6,6	1,7	14,05
1002	14,7	18,2	15,6	16,45	3,5	0,9	15,15
1000	15,1	17,8	16,2	16,45	2,7	1,1	15,65
1003	15,4	19	17	17,2	3,6	1,6	16,2
0-203	15,9	24,2	18,7	20,05	8,3	2,8	17,3
0-210	16,2	21,8	17,2	19	5,6	1	16,7
1061	19,6	26,3	29,5	22,95	6,7	9,9	24,55
0-453	20,6	23,8	32,6	22,2	3,2	12	26,6
1016	24,3	33,7	29,5	29	9,4	5,2	26,9
1023	38,2	42,7	43,8	40,45	4,5	5,6	41
1940	6,4	7,1	6,2	6,75	0,7	-0,2	6,3
1929	5,9	6,8	6,6	6,35	0,9	0,7	6,25
1925	6,2	8,1	6,7	7,15	1,9	0,5	6,45
1924	5,3	6,8	6,6	6,05	1,5	1,3	5,95

				Durchschnitt	Differenz	Differenz	Durchschnitt
Barcode:	Immolute 2500:	Centaur:	HPLC:	(Centaur+Immu)/2:	Centaur-Immu:	HPLC-Immu:	(HPLC+Immu)/2:
	(µmol/l)	(µmol/l)	(µmol/l)	(µmol/l)	(µmol/l)	(µmol/l)	(µmol/l)
1011	12,4	17,9	13,2	15,15	5,5	0,8	12,8
0-981	7,9	11	7,9	9,45	3,1	0	7,9
0-980	9,6	14,1	9,5	11,85	4,5	-0,1	9,55
0-978	8,4	10,5	9,5	9,45	2,1	1,1	8,95
0-935	4,1	6,4	5,6	5,25	2,3	1,5	4,85
0-252	7,2	7,6	7,8	7,4	0,4	0,6	7,5
0-247	13,4	18,6	14,7	16	5,2	1,3	14,05
1366	15,1	20,5	16,6	17,8	5,4	1,5	15,85
1365	16,3	17,9	18	17,1	1,6	1,7	17,15
1364	15,7	19	18,9	17,35	3,3	3,2	17,3
1363	15,6	18,5	18,6	17,05	2,9	3	17,1
1362	10,8	11,2	11,3	11	0,4	0,5	11,05
1361	10,5	11,6	11,6	11,05	1,1	1,1	11,05
1360	10,9	14,4	10,9	12,65	3,5	0	10,9
1359	11,1	14	11,4	12,55	2,9	0,3	11,25
1332	12,8	17,6	15,6	15,2	4,8	2,8	14,2
1331	13,7	16,3	15,2	15	2,6	1,5	14,45
1960	6,3	8,3	4,3	7,3	2	-2	5,3
1943	5,1	7,4	6,5	6,25	2,3	1,4	5,8
1458	5,6	7,5	9,5	6,55	1,9	3,9	7,55
1457	6,8	7,1	15	6,95	0,3	8,2	10,9
1375	14,8	20,1	14,5	17,45	5,3	-0,3	14,65
1374	11,9	15,3	12,6	13,6	3,4	0,7	12,25
1373	7,1	9,8	8,2	8,45	2,7	1,1	7,65
1372	8,6	11,2	9	9,9	2,6	0,4	8,8
1371	15,3	20	17,4	17,65	4,7	2,1	16,35
1370	16,6	21	17,6	18,8	4,4	1	17,1
1369	16,5	20	17,7	18,25	3,5	1,2	17,1
1368	16,6	20,1	18,2	18,35	3,5	1,6	17,4

				Durchschnitt	Differenz	Differenz	Durchschnitt
Barcode:	Immolute 2500:	Centaur:	HPLC:	(Centaur+Immu)/2:	Centaur-Immu:	HPLC-Immu:	(HPLC+Immu)/2:
	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)
1367	14,2	20,2	16,7	17,2	6	2,5	15,45
1481	8,8	10,8	10,1	9,8	2	1,3	9,45
1480	7,3	10,1	9,8	8,7	2,8	2,5	8,55
1479	9,9	14	10,2	11,95	4,1	0,3	10,05
1478	6	8,4	11,2	7,2	2,4	5,2	8,6
1475	8,6	11,9	11,8	10,25	3,3	3,2	10,2
1474	30,6	38,2	32,9	34,4	7,6	2,3	31,75
1473	28,6	35	32,3	31,8	6,4	3,7	30,45
1472	7,1	11,1	8,1	9,1	4	1	7,6
1463	12,1	15,4	13,4	13,75	3,3	1,3	12,75
1462	17,2	22,6	19,9	19,9	5,4	2,7	18,55
1461	11,6	15,1	14,8	13,35	3,5	3,2	13,2
1460	6	8,3	8,3	7,15	2,3	2,3	7,15
1485	30,7	34,2	30,6	32,45	3,5	-0,1	30,65
1482	9,7	13,1	11	11,4	3,4	1,3	10,35
1487	11,3	14,4	12,2	12,85	3,1	0,9	11,75
1489	12	13,6	11,7	12,8	1,6	-0,3	11,85
1490	9,6	11,7	10,8	10,65	2,1	1,2	10,2
1716	14,2	16,4	13,8	15,3	2,2	-0,4	14
1719	17	20,3	19,9	18,65	3,3	2,9	18,45
1720	18,6	20,5	18,8	19,55	1,9	0,2	18,7
1723	13,4	15,9	15,8	14,65	2,5	2,4	14,6
1724	16,3	19,1	17,6	17,7	2,8	1,3	16,95
1725	10,2	10,5	11,8	10,35	0,3	1,6	11
1726	12,4	13	12,6	12,7	0,6	0,2	12,5
1922	13,9	16,3	17,1	15,1	2,4	3,2	15,5
1926	16,6	20,2	18,5	18,4	3,6	1,9	17,55
1930	20,3	24,2	23	22,25	3,9	2,7	21,65
1931	17,7	20,1	19,3	18,9	2,4	1,6	18,5

				Durchschnitt	Differenz	Differenz	Durchschnitt
Barcode:	Immolute 2500:	Centaur:	HPLC:	(Centaur+Immu)/2:	Centaur-Immu:	HPLC-Immu:	(HPLC+Immu)/2:
	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)
1933	8,6	10,5	9,3	9,55	1,9	0,7	8,95
1935	22,5	28,1	27,3	25,3	5,6	4,8	24,9
1936	13,5	15	14,9	14,25	1,5	1,4	14,2
1937	14,2	17,4	15,7	15,8	3,2	1,5	14,95
1938	5,6	7,3	7,8	6,45	1,7	2,2	6,7
1486	34,4	40,7	36,3	37,55	6,3	1,9	35,35
1939	23,2	26,3	32,2	24,75	3,1	9	27,7
1941	13,4	14,5	14,5	13,95	1,1	1,1	13,95
1942	7,1	10,3	9,1	8,7	3,2	2	8,1
1944	29	32,8	33,6	30,9	3,8	4,6	31,3
1945	10,6	14,1	13,5	12,35	3,5	2,9	12,05
1946	8,8	9,9	10,2	9,35	1,1	1,4	9,5
1947	12,9	17	16,4	14,95	4,1	3,5	14,65
1955	13,2	14,6	14,2	13,9	1,4	1	13,7
1949	6,9	9,2	9,4	8,05	2,3	2,5	8,15
1950	7,8	9,2	10,6	8,5	1,4	2,8	9,2
1952	27,5	31,4	34,5	29,45	3,9	7	31
1953	27,7	31,3	32,8	29,5	3,6	5,1	30,25
1956	13,2	16,7	16,1	14,95	3,5	2,9	14,65
1961	8	9,6	9,4	8,8	1,6	1,4	8,7
1963	25	29,5	27,6	27,25	4,5	2,6	26,3
1964	27,9	30,7	29,5	29,3	2,8	1,6	28,7
1965	24,8	32,2	29,8	28,5	7,4	5	27,3
1966	27,5	31,8	29,8	29,65	4,3	2,3	28,65
1967	26,2	31,1	30,3	28,65	4,9	4,1	28,25
1968	25,3	26,2	27,1	25,75	0,9	1,8	26,2
1969	24,5	29,8	29,4	27,15	5,3	4,9	26,95
1970	26,7	30,5	30,5	28,6	3,8	3,8	28,6
1971	26,5	29,7	30,7	28,1	3,2	4,2	28,6

				Durchschnitt	Differenz	Differenz	Durchschnitt
Barcode:	Immolute 2500:	Centaur:	HPLC:	(Centaur+Immu)/2:	Centaur-Immu:	HPLC-Immu:	(HPLC+Immu)/2:
	(µmol/l)	(µmol/l)	(µmol/l)	(µmol/l)	(µmol/l)	(µmol/l)	(µmol/l)
1972	25,6	29,2	29,1	27,4	3,6	3,5	27,35
1973	27,8	36	33,4	31,9	8,2	5,6	30,6
1974	10,4	11,9	12,1	11,15	1,5	1,7	11,25
1977	11,8	14,3	13,3	13,05	2,5	1,5	12,55
1980	7,9	7,6	10,5	7,75	-0,3	2,6	9,2
1983	14,6	18,8	17,5	16,7	4,2	2,9	16,05

Methodenvergleich anhand von Dialysepatientenproben:

				Differenz	Durchschnitt	Differenz	Durchschnitt
Barcode	Immolute 2500	HPLC	Centaur	Centaur-Immolute 2500	(Centaur+Immu)/2	HPLC-Immolute 2500	(HPLC+Immu)/2
	(µmol/l)	(µmol/l)	(µmol/l)	(µmol/l)	(µmol/l)	(µmol/l)	(µmol/l)
2218	31,1	39,6	42,1	11	36,6	8,5	35,35
2219	18	25,3	26,4	8,4	22,2	7,3	21,65
2220	23	30,7	32	9	27,5	7,7	26,85
2221	33	49,4	45,7	12,7	39,35	16,4	41,2
2222	19,6	27,4	31,3	11,7	25,45	7,8	23,5
2223	21	28	31,3	10,3	26,15	7	24,5
2224	14,5	20,7	23,2	8,7	18,85	6,2	17,6
2225	49	70,1	63,1	14,1	56,05	21,1	59,55
2226	25,8	36,5	38,5	12,7	32,15	10,7	31,15
2227	21	29,3	34,4	13,4	27,7	8,3	25,15
2228	28,2	39,2	41,1	12,9	34,65	11	33,7
2229	19,7	27,7	30	10,3	24,85	8	23,7

				Differenz	Durchschnitt	Differenz	Durchschnitt
Barcode	Immulite 2500	HPLC	Centaur	Centaur-Immulite 2500	(Centaur+Immu)/2	HPLC-Immulite 2500	(HPLC+Immu)/2
	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)
2230	22,4	30,8	35,3	12,9	28,85	8,4	26,6
2231	18,4	24,4	29,6	11,2	24	6	21,4
2232	19,5	26,8	30,2	10,7	24,85	7,3	23,15
2233	24,5	35,2	37,2	12,7	30,85	10,7	29,85
2234	21,6	33,3	41,5	19,9	31,55	11,7	27,45
2235	20,3	29,6	36,6	16,3	28,45	9,3	24,95
2236	43	64	64,5	21,5	53,75	21	53,5
2237	20,8	29,4	33,9	13,1	27,35	8,6	25,1
2238	15,4	24,7	30,3	14,9	22,85	9,3	20,05
2239	19,6	28,2	36,3	16,7	27,95	8,6	23,9
2240	32,1	46,8	49,3	17,2	40,7	14,7	39,45
2241	17,5	24,2	33	15,5	25,25	6,7	20,85
2242	27,7	36,9	44,6	16,9	36,15	9,2	32,3
2243	25,3	36	43,9	18,6	34,6	10,7	30,65
2244	18	27,1	35,3	17,3	26,65	9,1	22,55
2245	16,3	24,1	27,2	10,9	21,75	7,8	20,2
2247	28,1	43,7	45,5	17,4	36,8	15,6	35,9
2248	21,3	31,2	36	14,7	28,65	9,9	26,25
2249	2,94	6,5	8,4	5,46	5,67	3,56	4,72
2250	21,8	31,4	37,3	15,5	29,55	9,6	26,6
2251	21,6	31	33,5	11,9	27,55	9,4	26,3
2278	17,5	26,3	28,2	10,7	22,85	8,8	21,9
2279	13	19,8	22,3	9,3	17,65	6,8	16,4
2280	24,9	34,3	37,1	12,2	31	9,4	29,6
2281	20	30,3	32,8	12,8	26,4	10,3	25,15
2282	28,9	44	42,3	13,4	35,6	15,1	36,45
2283	22,1	31,9	34,2	12,1	28,15	9,8	27
2284	25,3	36,9	37,9	12,6	31,6	11,6	31,1
2285	29,2	43,7	42,6	13,4	35,9	14,5	36,45

				Differenz	Durchschnitt	Differenz	Durchschnitt
Barcode	Immolute 2500	HPLC	Centaur	Centaur-Immolute 2500	(Centaur+Immu)/2	HPLC-Immolute 2500	(HPLC+Immu)/2
	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)
2286	28,5	45,6	44	15,5	36,25	17,1	37,05
2287	13,4	19,7	22	8,6	17,7	6,3	16,55
2288	19,4	26,9	33	13,6	26,2	7,5	23,15
2289	21	31,8	33,3	12,3	27,15	10,8	26,4
2290	41,2	65,3	56,7	15,5	48,95	24,1	53,25
2291	18,9	27,3	29	10,1	23,95	8,4	23,1
2292	18	26,1	28,2	10,2	23,1	8,1	22,05
2293	15	20,5	23	8	19	5,5	17,75
2294	27,3	41,8	37,5	10,2	32,4	14,5	34,55
2295	29	43,7	43,6	14,6	36,3	14,7	36,35
2296	21,8	34	34,1	12,3	27,95	12,2	27,9
2297	23,7	35,1	36,3	12,6	30	11,4	29,4
2298	25,2	40,9	41,4	16,2	33,3	15,7	33,05
2299	19,3	27,1	30,6	11,3	24,95	7,8	23,2
2300	36,1	52,8	49,4	13,3	42,75	16,7	44,45
2301	25,9	39,1	41,8	15,9	33,85	13,2	32,5
2302	20	32,6	33,4	13,4	26,7	12,6	26,3
2303	14,3	21,5	24,8	10,5	19,55	7,2	17,9
2304	11,2	18,2	21,4	10,2	16,3	7	14,7
2305	29,2	46,8	42,4	13,2	35,8	17,6	38
2306	15,5	23,4	27,7	12,2	21,6	7,9	19,45
2307	23	34,1	35,7	12,7	29,35	11,1	28,55
2308	19,6	29,8	32,7	13,1	26,15	10,2	24,7
2309	40,9	61,8	57,1	16,2	49	20,9	51,35
2310	15,8	27,5	28,7	12,9	22,25	11,7	21,65
2311	21,8	33,1	31,2	9,4	26,5	11,3	27,45
2312	27,5	42,4	42,1	14,6	34,8	14,9	34,95
2314	26,1	40	44,7	18,6	35,4	13,9	33,05
2315	18,4	27	32,1	13,7	25,25	8,6	22,7

				Differenz	Durchschnitt	Differenz	Durchschnitt
Barcode	Immolute 2500	HPLC	Centaur	Centaur-Immolute 2500	(Centaur+Immu)/2	HPLC-Immolute 2500	(HPLC+Immu)/2
	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)
2316	13	18,7	21,3	8,3	17,15	5,7	15,85
2317	18,3	30	34,7	16,4	26,5	11,7	24,15
2321	22,8	32,9	31,5	8,7	27,15	10,1	27,85
2322	18,4	27,7	33,4	15	25,9	9,3	23,05
2323	31,3	45	44,6	13,3	37,95	13,7	38,15
2324	10,1	15,1	15,9	5,8	13	5	12,6
2325	15,8	23,1	23,8	8	19,8	7,3	19,45
2326	17,9	22,4	22,5	4,6	20,2	4,5	20,15
2327	26	35,9	37,3	11,3	31,65	9,9	30,95
2328	31,7	41,4	42,8	11,1	37,25	9,7	36,55
2329	25,1	35,4	33	7,9	29,05	10,3	30,25
2331	19,2	27	26,1	6,9	22,65	7,8	23,1
2332	16,6	22,7	25,3	8,7	20,95	6,1	19,65
2333	30,3	42,5	41	10,7	35,65	12,2	36,4
2334	12,8	17,8	19,8	7	16,3	5	15,3
2335	25,4	36,4	36,7	11,3	31,05	11	30,9
2336	20,3	29,7	29,9	9,6	25,1	9,4	25
2337	31,7	47,3	47,5	15,8	39,6	15,6	39,5
2338	37,5	51,1	50	12,5	43,75	13,6	44,3
2339	22,3	31,5	37,1	14,8	29,7	9,2	26,9
2340	19	26,4	26,6	7,6	22,8	7,4	22,7
2341	38,7	56,5	53,8	15,1	46,25	17,8	47,6
2342	28,2	39,4	40,3	12,1	34,25	11,2	33,8
2343	49,2	70,8	62,5	13,3	55,85	21,6	60
2344	34,3	48,8	52,5	18,2	43,4	14,5	41,55
2345	23,9	33,5	37,1	13,2	30,5	9,6	28,7
2346	8,5	13,7	16	7,5	12,25	5,2	11,1
2347	23,3	31,9	34	10,7	28,65	8,6	27,6
2348	18,2	26	30	11,8	24,1	7,8	22,1

				Differenz	Durchschnitt	Differenz	Durchschnitt
Barcode	Immulite 2500	HPLC	Centaur	Centaur-Immulite 2500	(Centaur+Immu)/2	HPLC-Immulite 2500	(HPLC+Immu)/2
	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)	($\mu\text{mol/l}$)
2349	27,4	37,8	38	10,6	32,7	10,4	32,6
2350	49,8	69,2	61,2	11,4	55,5	19,4	59,5
2351	31,3	44	43,3	12	37,3	12,7	37,65
2352	31,4	45	45,9	14,5	38,65	13,6	38,2
2353	18	23,5	25,2	7,2	21,6	5,5	20,75
2354	32,2	47,7	48,6	16,4	40,4	15,5	39,95
2355	21,2	30,7	34	12,8	27,6	9,5	25,95
2356	43,9	60,1	57,4	13,5	50,65	16,2	52
2358	22,4	30,3	35,8	13,4	29,1	7,9	26,35
2359	10,3	14	16,3	6	13,3	3,7	12,15
2360	19,9	27,3	29,6	9,7	24,75	7,4	23,6